

A large, stylized pink ribbon is the background of the entire page. It is rendered in a light pink color with a slightly textured, brush-stroke-like appearance. The ribbon is tied in a loop on the right side, with the ends trailing off towards the bottom left and bottom right corners.

AValiação CITOGENÉTICA DE TUMORES MAMÁRIOS

Acadêmica: Heloisa Helena Zaccaron Milioli

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro

*Florianópolis,
Julho de 2008.*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPTO. DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA**

Heloisa Helena Zaccaron Milioli

AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DE TUMORES MAMÁRIOS

Trabalho de Conclusão
de Curso apresentado como
requisito para o cumprimento
da disciplina Estágio II (BIO
5156), presente no currículo
do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas - UFSC.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro

Agradecimentos

É com grande satisfação que dedico este espaço à todos que, de alguma forma, me ajudaram a alcançar mais esta etapa da minha vida, meus sinceros agradecimentos:

À *Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro*, pela oportunidade e orientação conferida, além da eterna amizade e apoio. Por dividir felicidades e angústias.

À *Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza*, à *Profa. Dra. Rozany Mucha Duflath* e à *Profa. Dra. Yara Costa Neto Muniz*, por fazerem parte da banca. Obrigada pelo tempo e dedicação ao analisar e avaliar este trabalho. Minha grande admiração e sinceros agradecimentos.

À *Profa. Dra. Elza Maria Prestes Sartorelli*, por quem tenho grande admiração e carinho.

Ao Hospital Universitário e à Universidade Federal de Santa Catarina, aos seus professores e funcionários, que contribuíram com sua dedicação, conhecimento e infraestrutura.

Às mulheres que, como pacientes, constituíram os dados da pesquisa e tornaram possível esse projeto. Por me fazerem acreditar que não devemos desistir da “Guerra”, que o câncer de mama deve ser apenas mais uma batalha à ser vencida.

À todos os meus companheiros de laboratório, por me acolherem, pelo carinho, compreensão e grande amizade.

Ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), pelo levantamento de dados e coleta das amostras.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho: muito obrigada!

Em especial...

À minha família, meus maiores incentivadores, pelo apoio incondicional e pelo carinho de sempre. Por acreditarem na minha capacidade, enquanto eu duvidava.

Aos meus pais, *Ademir e Eliane*, por abdicarem de seus sonhos em favor dos meus. Por fazerem dos meus objetivos, suas metas.

Ao meu único e eterno irmão, *Tito*. Por me entender com um olhar, com um gesto, e com uma simples palavra me confortar. Por tudo que representas pra mim e pelo presente mais precioso que deste, *Yuri*.

Ao *Jorge André*, pela paciência, cumplicidade e companheirismo em todos esses anos. Obrigada por me ensinar que a forma com que trilhamos os caminhos pode ser mais gratificante do que chegar ao fim da linha.

À *Helena e Lourdes*, por tudo que fizeram por mim, pelo amor que me dedicam sempre e pela confiança.

Aos meus cunhados amados, por me respeitarem, ou simplesmente por existirem.

“O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar seu tempo e amor, tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente).”

Prof. Newton Freire-Maia

Fundador do departamento de Genética da UFPR.

Resumo

AValiação citogenética de tumores mamários

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea, sendo o segundo tipo de neoplasia mais freqüente relacionada a morbidade e mortalidade entre as mulheres em todo o mundo. Apesar da etiologia ainda obscura, estudos em tumores de mama invasivo demonstraram uma freqüente relação com a aneuploidia – ganho ou perda de cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos – evidenciando a participação de eventos citogenéticos na tumorigênese. O objetivo do estudo inclui a identificação do número de cópias dos cromossomos 8 e 17, utilizando sondas centroméricas, bem como a caracterização morfológica dos núcleos interfásicos quanto ao grau de compactação, presença de micronúcleos e fragmentação apoptótica. Durante procedimentos cirúrgicos, realizados no Hospital Universitário/UFSC – 2007, 11 fragmentos tumorais foram removidos e transportados para o Laboratório de Citogenética, em meio RPMI, onde foi realizada a dissociação mecânica das amostras. As células suspensas foram fixadas em *Carnoy* e o material gotejado em lâminas de microscopia limpas e secas. Os núcleos obtidos foram caracterizados morfológicamente quanto ao grau de compactação, presença de micronúcleos e fragmentação apoptótica. Paralelamente houve a padronização da metodologia Híbridação “*in situ*” fluorescente (FISH), com a enumeração dos pares cromossômicos 8 e 17 em núcleos interfásicos. Resultados preliminares demonstraram a complexidade dos tumores mamários quanto aos parâmetros avaliados, sendo evidente a presença de aneuploidia através da análise com FISH. A correlação dos resultados obtidos com o anatomo-patológico e o estadiamento do tumor não evidenciou uma associação clara entre as amostras, mas individualmente pode fornecer subsídios para caracterizar a patogênese do câncer de mama e contribuir para a melhor estratificação dos tumores.

FAPESC. CNPq.

Palavras-chave: Câncer de mama, FISH, aneuploidia.

SUMÁRIO

Tabelas

Figuras

Abreviações

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1 Aspectos Epidemiológicos	1
1.2 Etiologia do Câncer de Mama.....	3
1.3 Susceptibilidade Genética e Ambiente.....	6
1.4 Instabilidade Cromossômica	9
1.5 Histopatologia dos Tumores Malignos da Mama	11
1.6 Avaliação Citogenética de Tumores Mamários	14
<u>2. JUSTIFICATIVA</u>	<u>17</u>
<u>3. OBJETIVOS</u>	<u>18</u>
3.1 Gerais	18
3.2 Específicos	18
<u>4. MATERIAIS E MÉTODO</u>	<u>19</u>
4.1 Abordagem Ética e Experimental	19
4.2 Seleção das Pacientes.....	19
4.3 Coleta de Material.....	19
4.4 Processamento das Amostras	20
4.5 Fixação das Células.....	20

4.6 Análise panorâmica dos núcleos interfásicos	20
4.7 FISH.....	21
4.8 Análise e Interpretação da FISH	21
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>22</u>
5.1 Caracterização da Amostra	22
5.2 Resultado Anatomopatológico e Imunohistoquímico.....	25
5.3 Avaliação dos Núcleos Interfásicos	28
5.5 Citogenética Molecular – FISH	32
5.5 Problemas com a Metodologia FISH.....	39
5.6 Considerações Finais	40
<u>6. CONCLUSÕES</u>	<u>41</u>
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>43</u>
<u>8. APÊNDICES</u>	<u>50</u>
8.1 Apêndice I.....	50
8.2 Apêndice II.....	52
8.3 Apêndice III	53

Tabelas

Tabela 01

Idade, altura, peso, índice de massa corporal, casos familiares de câncer em parentes de primeiro grau e o uso de terapias hormonais nas pacientes avaliadas.....23

Tabela 02

Índice de Massa Corporal (OMS).....24

Tabela 03

Diagnóstico Anátomo-Patológico e Imuno-histoquímica (IHQ) de neoplasias mamárias....26

Tabela 04

Núcleos apoptóticos, micronúcleos, grau de compactação nuclear e aneuploidia.....29

Tabela 05

Quantidade de sinais amplificados em 100 núcleos interfásicos.....34

Figuras

Figura 01

Incidência de câncer na população brasileira estimada para o ano de 2008 e 2009, com exceção de pele não melanoma.....02

Figura 02

Estrutura mamária.....12

Figura 03

Incidência de cancer de mama de acordo com a idade das pacientes.....23

Figura 04

Proporção de mulheres abaixo do peso, dentro de seu peso ideal, com peso acima do ideal (sobrepeso) e considerado obesas.....24

Figura 05

Possíveis resultados imunohistoquímicos na amplificação da proteína HER-2.....27

Figura 06

Frequência de núcleos blásticos, corpos apoptóticos e micronúcleo encontrados em cada amostra avaliada.....30

Figura 07

Presença de micronúcleos avaliados na amostra 76.....31

Figura 08

Presença de núcleos blásticos avaliados na amostra 69.....32

Figura 09

Cromossomos avaliados quanto amplificação da região centromérica.....33

Figura 10

Amplificação da região centromérica do cromossomo 8, nas amostras 70, 76 e 77.....35

Figura 11

Amplificação da região centromérica do cromossomo 17, na amostras 76 e 77.....36

Figura 12

Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 76.....36

Figura 13

Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 77.....37

Abreviações

AC - anticoncepcional
ATM - “ataxia telangiectasia mutated”
BEG - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
BRCA1 - “breast cancer 1”
BRCA2 - “breast cancer 2”
CCB - Centro de Ciências Biológicas
CSP - “*chromosome specific probe*” (sonda cromossomo específica)
DCIS - Carcinoma Ductal “*in situ*”
DM - “*double minutes*”
ER - Receptor de Estrogênio
FISH – “*Fluorescence in situ hybridization*” (hibridação “*in situ*” fluorescente)
HER-2 - receptor de fator de crescimento epidermal
HSR - “*homogeneously stained regions*” (regiões homogeneamente coradas)
HU - Hospital Universitário
IARC - International Agency for Research on Cancer
IBCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
IHQ - Imunohistoquímica
IMC - Índice de Massa Corporal
INCA - Instituto Nacional de Câncer
LCIS - Carcinomas lobulares “*in situ*”
MN - Micronúcleo
MYC - “v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)”
NB - Núcleo Blástico
NOS - “not otherwise specified” (sem outra especificação)
NST - “no special type” (sem tipo especial)
OMS - Organização Mundial da Saúde
PGR - Receptor de Progesterona
RH - Reposição Hormonal
TRH - Tratamento de Reposição Hormonal
TP53 - “Tumor Protein p53”
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
WHO - World Health Organizatio

1. Introdução

1.1 Aspectos Epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer vem se tornando uma das principais preocupações na área de saúde pública em nível mundial. Atualmente, existem aproximadamente 24,6 milhões de pessoas acometidas pela doença, sendo estimado até o ano 2020 um número aproximado de 30 milhões de doentes. Neste mesmo período, o câncer poderá matar mais de 10 milhões de pessoas por ano, sendo que mais de 60% dos casos ocorrerão em regiões menos desenvolvidas do globo (INCA – Estimativa: 2008).

Estima-se que, no ano de 2005, 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer em 58 milhões de mortes mundiais, o que representou 13% do total de óbitos (OMS, 2008). Mais de 70% das mortes pela doença ocorrem em países de transição, "subdesenvolvidos", e países considerados de renda média, da América do Sul e Ásia, onde os recursos disponíveis para a prevenção, diagnóstico e tratamento são limitados ou inexistentes. Em países desenvolvidos, o câncer segue como a segunda maior causa de morte sendo superado apenas por doenças cardiovasculares (World Health Organization - WHO, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam 466.730 novos casos de câncer na população, sendo esperados 231.860 novos casos para o sexo masculino e 234.870 para sexo feminino. Os tipos mais incidentes, à exceção dos tumores de pele não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008).

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais freqüente entre as mulheres no mundo. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama, representando nos países ocidentais uma das principais razões de óbito entre o sexo feminino. Este tipo da doença é provavelmente o mais temido devido a sua alta freqüência e, sobretudo, por seus efeitos psicológicos danosos, que afetam a percepção da sexualidade e a imagem física (INCA, 2008).

No Brasil, o aumento de casos de câncer de mama foi de 50% nas duas últimas décadas. De acordo com a estimativa de incidência de câncer no país para o ano de 2008, o câncer de mama feminino seria o segundo com maior incidência, 49.400 casos (Figura 01), e risco avaliado de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008).

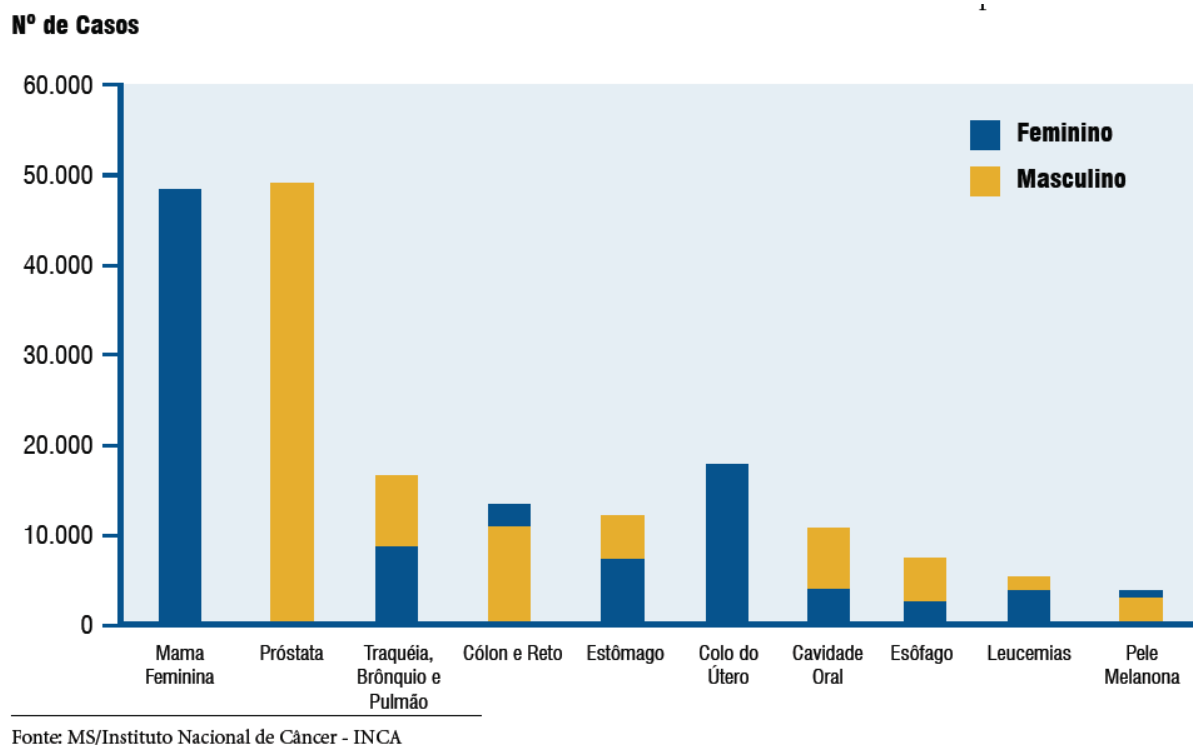


Figura 01. Incidência de câncer na população brasileira estimada para o ano de 2008 e 2009, com exceção de pele não melanoma.

Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil. O câncer de mama também aparece como o mais freqüente em mulheres das regiões Sul (67/100.000), apresentando o estado de Santa Catarina e sua capital, Florianópolis, um número de 1.610 e 130 novos casos, respectivamente, de acordo com as estimativas para 2008, válidas também para 2009 (INCA, 2008).

Apesar de ser considerado um câncer de prognóstico relativamente bom, as taxas de mortalidade por neoplasias mamárias continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente em decorrência de diagnóstico tardio (INCA, 2008), com aproximadamente 60% dos casos identificados em estágios avançados de acordo com o Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC, 2007).

Na população mundial a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA, 2008), sendo que um terço dos casos de câncer no mundo poderiam ser evitados através de ações preventivas, como mudanças no hábito de vida (IARC, 2007).

1.2 Etiologia do Câncer de Mama

Ao que tudo indica, o câncer de mama é o resultado da interação de fatores genéticos com o estilo de vida, hábitos reprodutivos e meio ambiente (JOHNSON-THOMPSON & GUTHRIE, 2000). A história familiar constitui um importante fator de risco para o câncer de mama, especialmente se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade. Os casos de câncer que apresentam origem hereditária (familiar) ocorrem devido à herança de uma mutação germinativa, o que confere a estas mulheres suscetibilidade ao desenvolvimento da neoplasia mamária (BILIMORIA & MORROW, 1995).

Acredita-se que 90-95% dos cânceres sejam esporádicos (não-familiares) ou decorram de mutações somáticas que se acumulam durante a vida (BALMAIN *et al.*, 2003), e que 5-10% sejam hereditários, explicados por mutações germinais raras em genes de alta penetrância como o BRCA1 e BRCA2 (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Apesar da incidência do câncer de mama hereditário ser relativamente pequena, o risco para o desenvolvimento de tumores mamários em mulheres portadoras de mutações em um dos genes responsáveis por esta predisposição pode chegar a até 80% (HABER & FEARON, 1998).

A menarca precoce (idade da primeira menstruação), a menopausa tardia (após os 50 anos de idade), a ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e a nuliparidade (não ter tido filhos), constituem também fatores de predisposição ao câncer de mama (INCA, 2008). Isto porque o número maior de ciclos menstruais aumentam a probabilidade de desenvolvimento da doença (HENDERSON & FEIGELSON, 2000). Além desses, a idade continua sendo um dos

mais importantes fatores de risco, havendo um aumento rápido da incidência com o aumento da idade (INCA, 2008).

Alguns estudos indicam dois tipos de câncer de mama associados com a idade: o primeiro ocorre na pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e negativo para o receptor de estrogênio (ER); o segundo aparece na pós-menopausa e está associado com características indolentes e principalmente por ser positivo para ER. As variações morfológicas também estão relacionadas ao ER, como os carcinomas medulares (ER – negativos) e os carcinomas tubulares e lobulares (ER – positivos) (INCA, 2008).

A relação entre hormônios e o desenvolvimento do câncer de mama foi reconhecida há mais de um século. Essa associação surgiu inicialmente em 1896, com George Beatson, a partir da observação da eliminação da função ovariana, a maior fonte de estrogênio, através de ooforectomia, que beneficiava mulheres com a doença inoperável. O estrogênio, neste caso, atua estimulando a proliferação das células epiteliais de glândulas mamárias, útero e vagina, penetrando a célula alvo e interagindo com receptores intracelulares (LEE *et al.*, 2008).

A associação entre o risco do câncer de mama e níveis sanguíneos altos de estrogênio, endógenos ou exógenos, foi encontrada em diversos estudos subsequentes, de forma consistente. Em recente revisão, COLLINS *et al.* (2005) observou uma associação do risco de câncer de mama com tratamento de reposição hormonal (TRH) na menopausa, identificando maior risco para mulheres em tratamento quando comparadas a não tratadas ou com as que interromperam o tratamento. Para essas últimas, o risco diminuiu logo após o encerramento da administração hormonal atingindo parâmetros populacionais normais em cinco anos. Alguns artigos sugerem ainda que o TRH aumenta de 27% a 35% o risco de desenvolvimento de câncer de mama invasivo, com um risco adicional de 2,3% por ano de uso de hormônio (LEE *et al.*, 2008).

A relação entre o uso de contraceptivos orais com o aumento do risco para o câncer de mama ainda não foi totalmente esclarecida, sugerindo maior relação em determinados subgrupos de mulheres como as que usaram contraceptivos orais com dosagens elevadas de estrogênio, as que fizeram uso da medicação por longo período e as que usaram anticoncepcional em idade precoce, antes da primeira gravidez (MARCHBANKS *et al.*, 2002). Neste caso, a prescrição tanto de anticoncepcionais orais, como da terapia de reposição hormonal devem ter, sempre, a relação risco-benefício bem avaliada (INCA, 2008).

Há ainda evidências de que a alimentação desempenha um papel importante nos estágios de iniciação, promoção e propagação do câncer, destacando-se entre outros fatores de risco. A relação entre hábitos alimentares e o risco para o desenvolvimento de neoplasias apresenta evidências científicas, apesar da complexidade dos fatores que estão associados à ingestão de alimentos, como conservação e preparo, tipo e quantidade de produto consumido (INCA, 2008). A baixa ingestão de frutas e verduras e o elevado consumo de gorduras e laticínios, podem estar associados ao aumento da predisposição à doença. Entre as mortes por câncer atribuídas a fatores ambientais, a dieta contribui com cerca de 35%. Acredita-se que uma dieta adequada poderia prevenir de três a quatro milhões de casos novos de câncer a cada ano (GLANZ, 1997).

A obesidade, também, tem sido associada ao aumento global do risco de câncer (WHO, 2008). Uma forte relação entre peso corporal relativo e câncer de mama foi evidenciado em diversos estudos (GREENWALD *et al.*, 2001; KEY *et al.*, 2003). No período de pós-menopausa pode ocorrer uma potencialização do risco de câncer de mama associado a obesidade, essa relação ocorre pela alta concentração de estrogênio circulando em mulheres com maior quantidade de tecido adiposo, o que aumenta a conversão periférica de hormônios precursores do estrogênio (HANKINSON *et al.*, 1995).

A ingestão regular de álcool, mesmo que em quantidades moderadas, é identificada como fator de risco para o câncer de mama. O consumo de álcool entre 22-27 doses por semana apresentou um aumento do risco em duas vezes para o desenvolvimento do câncer de mama, quando comparado às mulheres que consomem 1-3 doses semanais (MORCH *et al.*, 2005). Lash e Aschengrau (2000) acreditam que a explicação mais plausível seja que a ingestão de álcool modifique o metabolismo e remoção dos componentes do estrogênio, desta forma aumentando a exposição do tecido mamário a este hormônio.

Outro fator que influencia na incidência do câncer de mama é o tabagismo. O fumo apresenta componentes em sua fórmula que atuam nos estágios da carcinogênese, num processo multifatorial induzido e modulado por inúmeros fatores endógenos e exógenos (INCA, 2008). Mulheres regularmente expostas ao cigarro, mesmo fumantes passivas, apresentaram um aumento no risco de desenvolver câncer de mama, em oposição àquelas que nunca se expõem ao tabaco, num risco particularmente associado ao período pre-menopausal (JOHNSON, 2005). Essa relação foi observada principalmente em mulheres com histórico de hábitos tabagistas por longo período de tempo (TERRY *et al.*, 2002).

A atividade física, por outro lado, ocupa um papel importante na proteção contra diversas formas de neoplasias, como os carcinomas mamários. Isso ocorre porque o exercício físico reduz os níveis de estrogênio no corpo. A atividade física de maneira regular, prescrita corretamente está relacionada à redução dos riscos de câncer em até 30%, além de ser um efetivo mecanismo no controle de peso (PEDROSO *et al.*, 2005).

A prevenção primária do câncer de mama ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Novas estratégias de rastreamento factíveis para países com dificuldades orçamentárias têm sido estudadas. No Brasil, a mamografia é o método mais utilizado na detecção precoce do câncer de mama em mulheres com faixa etária entre 50 e 69 anos, atuando de forma preventiva e também como método diagnóstico (INCA, 2008).

1.3 Susceptibilidade Genética e Ambiente

O câncer é um termo genérico utilizado para um grupo de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer tecido do organismo, sendo frequentemente conhecido por sua localização topográfica, atingindo qualquer parte do corpo (INCA, 2008). Uma característica da doença é a rápida proliferação de células anormais que corrompem a arquitetura tissular e avançam além de seus limites usuais, podendo invadir tecidos adjacentes e disseminar em outros órgãos, num processo denominado metástase. O câncer assim formado pode apresentar características benignas e malignas, sendo esta capaz de invadir tecidos adjacentes e formar novos tumores. Quanto mais metástase um tumor for capaz de induzir, mais difícil será sua erradicação (ALBERTS *et al.*, 2004).

O câncer surge como consequência de um processo de múltiplas etapas, resultando no acúmulo de alterações genéticas (ROGATTO & RAINHO, 2004). A exposição das células a agentes carcinogênicos pode acarretar mutação, sendo estimada a necessidade de 4-7 alterações genéticas para o surgimento da doença (PINTO & FELZENSZWALB, 2003). Após os eventos consecutivos da malignidade, as células transformadas apresentam autonomia para proliferar e disseminar em outros tecidos, tornando-se invasivas (ALBERTS *et al.*, 2004).

Estas mutações podem ocorrer espontaneamente, ou ser induzidas por uma gama de agentes ambientais. O DNA celular está sobre constante ataque de agentes exógenos que danificam diversas moléculas de suas bases nucleotídicas (LOURO *et al.*, 2002). As quebras de fita dupla do DNA ocorrem espontaneamente com certa frequência, mas podem também ser induzidas diretamente por agentes ionizantes, alguns antibióticos ou endonucleases, ou indiretamente por radiação UV e agentes químicos mutagênicos (OBE *et al.*, 2002).

Os alvos celulares mais críticos são os genes associados à indução e controle da proliferação e diferenciação celular, tais como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Enquanto os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada, a atuação dos genes supressores de tumor mantém essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular. Muitos destes genes foram reconhecidos como homólogos celulares de oncogenes virais, enquanto outros estão associados à características hereditárias da predisposição ao câncer. A ativação de oncogenes cooperando entre si e a desativação de genes supressores tumorais são eventos complementares necessários para a completa transformação neoplásica (LOURO *et al.*, 2002).

A amplificação de genes receptores de fatores de crescimento é comum em tumores mamários humanos, como HER-2 localizado no braço longo do cromossomo 17q11-12, também denominado, de acordo com *HUGO Gene Nomenclature* (2008), ERBB2, C-erbB-2, HER-2, NEU. O proto-oncogene HER-2 codifica uma glicoproteína transmembrana de 185 kDa com atividade de tirosina quinase que atua como receptor de fator de crescimento, estando envolvida na diferenciação, adesão e mobilidade celulares (ANDRÉ *et al.*, 2005). As vias de sinalização induzidas pela ativação da proteína HER-2 podem levar à inibição da apoptose e facilitar a proliferação celular (PUPA *et al.*, 2005).

Os oncogenes derivados de receptores de fatores de crescimento tornam as células independentes desses próprios fatores para a sua proliferação (LOURO *et al.*, 2002). Esse fato apresenta uma importância clínica relevante para determinação do prognóstico e, também, como preditivo na terapêutica. Estudos relacionando a expressão do HER-2 com resistência à terapia endócrina com tamoxifen no câncer de mama sugerem uma interação direta do HER-2 com receptores de estrogênio localizados na membrana plasmática. Recentemente foi desenvolvido o anticorpo monoclonal anti-HER-2, denominado trastuzumab (Herceptin®, Genentech, San

Francisco, CA), que se liga com grande afinidade ao domínio extracelular do HER-2, inibindo a transmissão de sinais de estimulação ao crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2003)

Alguns oncogenes possuem a capacidade de inibir a apoptose, como é o caso do oncogene c-MYC (LOURO *et al.*, 2002), localizado na região 8q24, no braço longo do cromossomo 8. O proto-oncogene MYC codifica uma proteína nuclear que está envolvida no metabolismo de ácidos nucleicos e na mediação da resposta celular a fatores de crescimento. Outro efeito, ainda, é atribuído a sua habilidade de induzir danos no DNA, promovendo rearranjos cromossômicos grosseiros, alterando de forma inapropriada a progressão do ciclo celular e prejudicando o reparo do DNA. O truncamento do primeiro exon, que parece regular a expressão do MYC, é crucial para a tumorigenicidade (DOMINGUEZ-SOLA *et al.*, 2007).

Os genes supressores de tumor, dentre eles BRCA1 (17q21), BRCA2 (13q12.3) e TP53 (17q13.1), regulam negativamente a proliferação celular ou positivamente a morte celular programada (apoptose) e codificam proteínas que atuam na manutenção da integridade do genoma, protegendo as células de um crescimento desordenado (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). O gene supressor de tumor TP53 constitui o alvo mais comum em tumores esporádicos humanos, sendo encontrado em cerca de 40% dos tumores mamários (PINTO & FELZENSZWALB, 2003).

Os genes pertencentes a família BRCAx foram classificados como supressores tumorais devido a perda da heterozigotidade nos tumores desenvolvidos por indivíduos portadores de mutações nesses genes. De acordo com Amendola & Vieira (2005), a prevalência estimada para portadores de mutações em BRCA1/2 são, respectivamente, 0,11% e 0,12% na população em geral e entre 12,8% a 16% em famílias de alto risco com três ou mais casos de câncer de mama ou ovário. No entanto, mutações germinais nesses genes são encontradas em apenas 20% dos casos de câncer familiar (HEDENFALK *et al.*, 2002).

As estimativas iniciais para o risco de desenvolvimento de câncer de mama ao longo da vida – penetrância – em mulheres portadoras de mutação no gene BRCA1, eram superiores a 85% (AMENDOLA & VIEIRA *appud* PONDER, 2005). Revisões recentes da literatura, no entanto, sugerem um risco de 50% a 80% para o desenvolvimento de câncer de mama até os 70 anos. O risco para portadores de mutações em BRCA2 se aproxima daquele estimado para BRCA1, embora o acometimento em idade mais avançada seja relatado (AMENDOLA & VIEIRA, 2005).

A presença de histórico familiar de câncer de mama, a bilateralidade, o acometimento precoce e achados histopatológicos específicos são fatores sugestivos da presença de mutações nestes genes (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Mutações nos genes TP53 e ATM também estão associadas às formas familiares, mas admite-se que ainda existam genes não identificados envolvidos na predisposição hereditária ao desenvolvimento do câncer de mama. Apesar do risco cumulativo da manifestação de um tumor em pacientes que herdaram uma cópia mutada dos genes BRCA ser maior, a ocorrência de um tumor ao longo da vida destes indivíduos também depende de outros fatores de risco variáveis (LOURO *et al.*, 2002).

1.4 Instabilidade Cromossômica

Os genes individualmente podem conter mutações, assim como cromossomos inteiros, que carregam milhares desses genes e estão severamente envolvidos em processos de duplicação, quebras, rearranjos e deleções, provocando instabilidade cromossômica e celular (DUESBERG & LI *et al.*, 2005). As alterações cromossômicas numéricas e estruturais, melhor que genes isolados, são suficientes para iniciar e sustentar a malignidade, além de esclarecer características de células cancerosas, em tumores sólidos, que a hipótese de mutação no gene único deixa indeterminada (DUESBERG, 2007).

Muitos cientistas sugerem que a maioria dos tumores sólidos malignos que ocorrem em humanos são caracterizados pela instabilidade cromossômica (do inglês *Chromosomal Instability* CIN), envolvendo o ganho ou a perda de cromossomos inteiros ou parte deles, e deve ser descrita pela variabilidade célula a célula ou entre populações celulares. A CIN aparece nos eventos iniciais da tumorigênese e deve, portanto, estar envolvida na indução do processo neoplásico. Apesar de ocorrer frequentemente nos tumores e apresentar um grande potencial para a evolução do câncer, a definição de CIN é, ainda, errônea e usada de forma inconsistente e imprecisa (GEIGL *et al.*, 2008).

Dentre as diferentes formas conhecidas de instabilidade genômica a instabilidade cromossômica constitui a mais prevalente (GEIGL *et al. appud* LENGAUER, 2008). Segundo Geigl *et al.*, para que seja determinada a presença de CIN, além da aneuploidia, devem ser

incluídos na descrição outras alterações cromossômicas como: rearranjos, deleções, inserções, inversões e amplificações.

A princípio, existem dois caminhos para a célula se tornar aneuplóide: pode haver uma alteração no número total de cromossomos inteiros, conhecida como aneuploidia completa, ou uma aberração originada a partir de erros no processo de divisão celular (mitose). De forma alternativa, podem ocorrer rearranjos cromossômicos incluindo deleções, amplificações ou translocações, aumentando as quebras do DNA que resultam em aneuploidias segmentais, sendo essas, a melhor causa estabelecida para o desenvolvimento tumoral (GEIGL *et al.*, 2008).

Em consequência de eventos que geram aneuploidia, o conteúdo total do DNA de uma célula tumoral pode elevar-se em mais de duas vezes ou cair quase à metade, comparado a uma célula normal (DUESBERG, 2007), constituindo a alteração genética mais comumente observada em tumores sólidos (KOPS *et al.*, 2005). Entretanto a aneuploidia em si, não é sinônimo de instabilidades cromossômica. Esse fato pode ser exemplificado pela Síndrome de Down, trissomia do cromossomo 21, em humanos (GEIGL *et al.*, 2008).

Uma vez que a aneuploidia é estabelecida, rearranjos adicionais nos cromossomos tornam-se mais prováveis. Essa instabilidade permite que células tumorais evoluam individualmente apresentando novas características e comportamentos (fenótipos), ao contrário das células normais do organismo, com características pré-determinadas no órgão ou no tecido. Tais desequilíbrios grosseiros levam, inevitavelmente, ao descontrole de etapas críticas na síntese de enzimas, incluindo aquelas envolvidas no reparo do DNA e conduzindo à instabilidade de estruturas celulares além de circuitos regulatórios imprescindíveis (DUESBERG, 2007).

Os cariótipos apresentados por células tumorais invasivas estão sempre associados à aneuploidia (DUESBERG, 2007). A perda ou ganho de cromossomo pode aumentar a chance de um gene supressor de tumor perder sua heterozigosidade ou amplificar um oncogene, aumentando as chances do desenvolvimento de um tumor (KOPS *et al.*, 2005).

Uma célula aneuplóide pode gradualmente perder responsabilidades sociais em um organismo multicelular multiplicando-se de forma autônoma, às custas de outras células. Este ponto de vista possui implicações importantes para o tratamento e prevenção do câncer, bem como para o diagnóstico de lesões pré-carcinogênicas (DUESBERG, 2007). Estudos em tumores de mama invasivos demonstraram que 60-80% são aneuplóides, comprovando a participação de eventos citogenéticos na tumorigênese (LINGLE *et al.*, 2002).

Cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos que se “atrasam” durante a divisão celular podem formar núcleos menores, também envoltos por citoplasma, denominados micronúcleos. A presença dessas estruturas nas células pode ser de fato considerada um marcador de CIN, sem necessariamente precisar da visualização cromossômica ou de regiões genômicas específicas. A contagem de micronúcleos (MN) é um método popular de análise, pois permite uma rápida evolução para o diagnóstico de centenas de células, entretanto não é suficiente para especificar a origem dessas estruturas, se constituídas de cromossomos inteiros ou partes deles (GEIGL *et al.*, 2008).

As estruturas celulares mais complexas, também as mais vulneráveis, são os aparelhos mitóticos na segregação dos cromossomos durante a divisão celular. O aumento da frequência de aberrações cromossômicas e defeitos nos centrossomos (centríolos) também está relacionado à agressividade das neoplasias (WANG *et al.*, 2004).

As anormalidades cromossômicas têm sido utilizadas como marcadores de diagnóstico e prognóstico em tumores humanos e têm possibilitado a identificação de genes específicos nos segmentos cromossômicos alterados (ROGATTO & RAINHO, 2004). Carcinomas mamários, como outros tipos de câncer, apresentam aneuploidias cromossômicas freqüentes que resultam desequilíbrios genômicos estritamente conservados (HESELMAYER-HADDAD *et al.*, 2002).

1.5 Histopatologia dos Tumores Malignos da Mama

O câncer de mama é classificado de acordo com o tipo de célula no qual ele iniciou, incluindo células do carcinoma, estromais, linfoblásticas, endoteliais e por subtipos patológicos distintos, e com a extensão de sua disseminação. A neoplasia mamária pode originar-se nas glândulas lactíferas, nos canais lactíferos, no tecido adiposo ou no tecido conjuntivo (Figura 02). A diversidade no aspecto clínico do câncer de mama está relacionado a diferenças nas taxas de crescimento do tumor, invasão tumoral, potencial metastático e outros sinais complexos de crescimento celular e manutenção das células (GOLDSCHMIDT, 2000).

Os diferentes tipos de cânceres de mama evoluem de formas distintas. As generalidades sobre os tipos particulares são baseadas nas similaridades quanto à forma como eles são detectados, como eles evoluem e como eles são tratados. Perto de 90% de todos os tumores de

mama ocorrem nos ductos ou lobos, com quase 75% deles, se iniciando na camada de células dos ductos lactíferos. Estes tumores são denominados carcinomas ductais. Tumores que aparecem nos lobos são chamados de carcinomas lobulares e são mais propensos a aparecerem de bilateralmente. Outros tumores de mama menos comuns incluem tumores medulares (5% dos tumores de mama), mucinosos, tubulares, papilares ou inflamatórios.

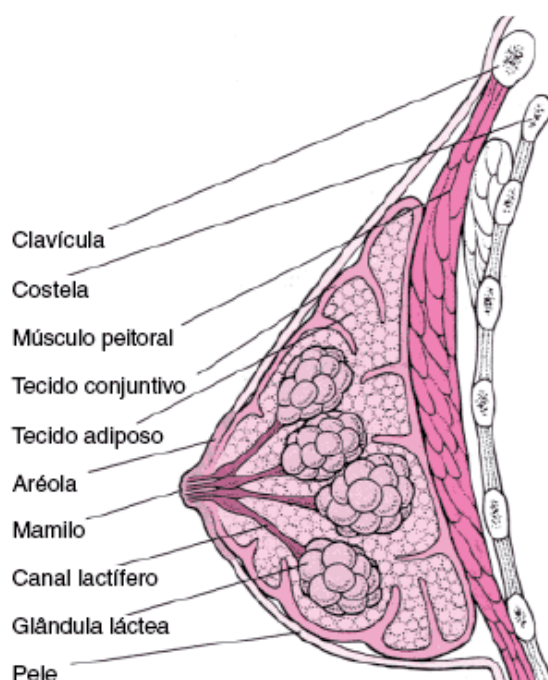


Figura 02: Estrutura mamária. (Fonte - www.msd-brazil.com)

Desde a mais recente revisão da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1982, a base da classificação dos tumores malignos mamários tem se mantido relativamente sem modificações (GOLDSCHMIDT, 2000). Embora a compreensão biológica do câncer de mama tenha evoluído com as novas metodologias de estudo, esta tradicional classificação ainda se mantém relevante para o envolvimento clínico no diagnóstico e tratamento de tumores malignos de mama (OMS, 2008), classificados da seguinte forma:

Carcinomas *in situ* são caracterizados por apresentarem proliferação de células epiteliais malignas confinadas aos ductos ou lóbulos mamários como, por exemplo, carcinoma ductal *in*

situ (DCIS), também denominado carcinoma intraductal ou carcinoma não invasivo, e carcinomas lobulares *in situ* (LCIS).

Carcinoma ductal infiltrante apresenta o pior prognóstico de todos os tipos ductais e cerca de 70% formam metástases nos linfonodos axilares. Uma grande variedade de tipos histológicos de carcinomas invasivos (infiltrantes) de mama tem sido descritos. O carcinoma infiltrante designado NOS (“not otherwise specified” = sem outra especificação) ou NST (“no special type” = sem tipo especial), em que nenhuma característica histopatológica especial é reconhecida, compreende aproximadamente 70% dos cânceres de mama.

Carcinoma mucoso, mucinoso ou colóide, outro tipo ductal, compreende 3% dos carcinomas mamários. Apresenta baixo crescimento, mas pode alcançar proporções volumosas. Quando o tumor é predominantemente mucoso, o prognóstico tende a ser favorável.

Carcinomas medulares apresentam lesões limitadas que podem alcançar grandes dimensões, mas demonstram propriedades infiltrativas de baixo grau. Constituem de 5 a 7% de todos os carcinomas mamários e são caracterizados por uma margem bem delimitada, núcleos pobremente diferenciados, padrão de crescimento sincicial e uma infiltração intensa por pequenos linfócitos e plasmócitos.

Carcinoma tubular consiste em tumor bem diferenciado no qual há formação de túbulo notável. Este diagnóstico é feito somente se 75% ou mais do tumor é composto destes elementos. Metástases axilares são incomuns, e o prognóstico é consideravelmente melhor do que o do carcinoma ductal NOS.

Carcinoma lobular infiltrante geralmente ocorre antes da menopausa, com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. É relativamente incomum, representando apenas 5 a 10% dos casos de tumores de mama. A apresentação clínica é frequentemente numa área de espessamento mal definido na mama, diferente da massa dominante do carcinoma ductal. Apresenta, ainda, uma proporção maior de tumores multicêntricos na mesma mama ou na mama oposta do que a encontrada em carcinoma ductal NOS. O carcinoma lobular infiltrante tem uma propensão a envolvimento de linfonodos axilares e o prognóstico é similar ao carcinoma ductal infiltrante. Entre 25 e 30% das mulheres que apresentam este tipo de tumor acabam desenvolvendo um câncer de mama invasivo. Os sítios de metástases tendem a diferir, já que enquanto os carcinomas ductais metastatizam mais caracteristicamente para ossos ou para sítios

dentro dos parênquimas do pulmão, fígado ou cérebro, os carcinomas lobulares mostram uma predileção para meninges e superfícies serosas.

A **Doença de Paget** manifesta-se inicialmente como uma lesão do mamilo crostosa ou descamativa ou como uma secreção do mamilo. As alterações no mamilo são associadas a um carcinoma subjacente na mama que pode ser palpado em metade a 2/3 das pacientes. Este tumor pode ser do tipo intraductal ou invasivo, sendo o prognóstico relacionado ao tipo histológico do tumor associado, ocorrendo em 1% de todas as pacientes com câncer de mama.

Carcinoma de mama inflamatório caracteriza-se clinicamente por edema proeminente na pele, vermelhidão e ardor, uma visível margem erisipelóide e endurecimento do tecido subjacente. Em aproximadamente metade das pacientes a massa não é palpável. Estes critérios, no passado, eram suficientes para o diagnóstico, mas atualmente, pode ser obtida comprovação anátomo-patológica por uma biopsia da pele demonstrando envolvimento dos linfáticos dérmicos com células cancerosas. O prognóstico das pacientes com esta doença é desfavorável, mesmo quando ela está aparentemente localizada.

Cistossarcoma Filodes é um tipo relativamente raro de tumor de mama que pode apresentar características malignas e comportamento biológico incerto. Esses tumores raramente disseminam-se para outras áreas, mas, após a remoção cirúrgica, eles tendem a reaparecer no mesmo local. O tratamento usual é a remoção do tumor e de uma ampla margem de tecido normal circunvizinho (excisão ampla).

A classificação histopatológica do carcinoma de mama tem pobre valor preditivo. Portanto, a associação entre o diagnóstico com técnicas moleculares nos laboratórios de anatomia patológica, por meio do estudo imunohistoquímico, pode determinar o perfil molecular do carcinoma de mama, buscando melhorar a resposta terapêutica (VIEIRA *et al.*, 2007)

1.6 Avaliação Citogenética de Tumores Mamários

Muitas aberrações cromossômicas observadas em células tumorais mamárias não são específicas do tumor. Cariótipos nesses tumores mostram frequentemente multiclonalidade, sugerindo a existência de um alto grau de heterogeneidade intratumoral. Alterações nos braços cromossômicos de 1q, 3p, 6q, 8p estão geralmente presentes, bem como inversão 1q e

translocação t(1;16). Aneuploidias +7, +8 e +20 e regiões homogeneamente coradas (HSR) também são comumente observadas e parecem estar preferencialmente associadas ao cromossomo 8 (MITELMAN *et al.*, 1997). Essas aberrações recorrentes evidenciam a presença de rearrajos genômicos, e indicam que a instabilidade genética pode estar presente em muitos desses tumores (SILVA, 2004).

O desenvolvimento da tecnologia hibridização *in situ* por fluorescência (do inglês *fluorescence “in situ” hybridization* - FISH) pode ser considerado o progresso mais importante da citogenética nos últimos anos. A FISH permitiu a detecção de seqüências específicas de ácidos nucléicos em cromossomos de células e tecidos preservados (ROGATTO, 2000). A metodologia, utilizada na análise de tumores sólidos, possibilitou a identificação de anormalidades cromossômicas diretamente em células interfásicas, simplificando problemas técnicos de cultura e análise, que têm limitado a caracterização do genoma destes tumores usando apenas a citogenética convencional (GEIGL *et al.*, 2008).

A técnica de hibridação envolve segmentos de DNA ou RNA, quimicamente modificados, que são usados como sondas e reconhecem especificamente um único par cromossômico (*chromosome specific probe* ou CSP), formando *duplex* em regiões pré-determinadas, tais como centrômeros, telômeros e, até mesmo, um loco específico. FISH toma o lugar de outras técnicas na identificação de anormalidades além da resolução visual, como microdeleções, ou quando um rearranjo cromossômico envolve regiões camufladas na leitura pela banda (rearranjos críticos) ou de difícil interpretação (rearranjos dentro do cromossomo), otimizando os resultados da análise (VARELLA-GARCIA *et al.*, 2004).

Estudo de células em metáfase facilitam a detecção de translocação envolvendo cromossomos marcados com a sonda, o que tem permitido um diagnóstico mais preciso em casos de alterações no material genético (NATARAJAN & BOEI, 2003). Da mesma forma, sua utilização ocorre com sucesso em células interfásicas, quando anormalidades numéricas e algumas estruturais podem ser visualizadas (VARELLA-GARCIA, 2003). Essa propriedade, de fato, agrega um alto valor no estudo do câncer, já que um número considerável de células pode ser estabelecido quanto a anormalidades clonais específicas, presentes somente em poucos casos. A utilização de sondas centroméricas, por exemplo, evidencia a ausência e/ou presença de sinais específicos na região central do cromossomo, permitindo a interpretação e classificação de células aneuploides (GEIGL *et al.*, 2008).

A técnica de FISH subsidiou novas oportunidades para utilização de tumores sólidos, possibilitando a identificação de anormalidades cromossômicas diretamente em células interfásicas, obtidas a partir de suspensões, tecido congelado ou fixado e tecido emblocado em parafina, além de outras preparações cromossômicas. São inúmeras, portanto, as aplicações dessa metodologia em estudos citogenéticos para identificação de cromossomopatias, diagnóstico pré-natal, reconhecimento de doenças virais, monitoramento pós-transplante, leucemias e na pesquisa básica (detecção de alterações cromossômicas em células tumorais e estudos de expressão gênica) (ROGATTO, 2000). Na pesquisa, aparece como técnica fundamental no mapeamento físico dos cromossomos (VIANNA-MORGANTE, 2004).

Um dos benefícios da metodologia FISH é a possibilidade de fornecer informações para o diagnóstico e manejo do paciente, que são difíceis ou até impossíveis de serem obtidas clinicamente ou por métodos laboratoriais. Essa análise pode permitir a identificação de cromossomos marcadores, rearranjos estruturais, nível de ploidia e pode ser utilizada, ainda, em estudos de amplificação gênica (ROGATTO & RAINHO, 2004). A desvantagem da FISH interfásica, por outro lado, consiste na limitação do número de sondas que podem ser usadas simultaneamente (GEIGL *et al.*, 2008).

2. Justificativa

A diversidade no aspecto clínico do câncer de mama está indubitavelmente relacionada a alterações oriundas de um processo de múltiplas etapas, caracterizado por mutações genéticas que direcionam a progressão do tecido normal para tumoral. Em células neoplásicas, um número significativo de alterações cromossômicas vem sendo detectado, sendo o seu estudo fator determinante na elucidação da doença. A avaliação citogenética, neste caso, pode fornecer informações adicionais importantes para a estratificação do tumor e orientação terapêutica, proporcionando um diagnóstico individual e diferenciado.

A metodologia FISH, ou citogenética molecular, é amplamente apreciada e particularmente útil na avaliação de tumores sólidos, onde a obtenção de metáfases é considerada de difícil alcance, principalmente por conflitos existentes no cultivo e manutenção de células tumorais (VARELLA-GARCIA, 2003). Além disso, esta metodologia é considerada o padrão ideal para a detecção da amplificação gênica do HER-2, procedimento indispensável na utilização da droga trastuzumab (Herceptin®), eficaz somente em pacientes que apresentam a superexpressão desta proteína.

A padronização das metodologias para processamento das amostras tumorais, a avaliação citogenética e a técnica de FISH vem de encontro ao número crescente de resultados validados e suas aplicações clínicas. O uso de sondas centroméricas contribui, especificamente, para o diagnóstico de aneuploidia em tumores sólidos (ROGATTO & RAINHO, 2004), sendo relevante o estudo de cromossomos que apresentam genes críticos no desenvolvimento de neoplasias mamárias. Nos cromossomos 8 e 17 estão localizados os oncogenes c-MYC (8q24) e HER-2 (17q21), respectivamente, além da presença dos genes supressores tumorais BRCA1 (17q21) e TP53 (17p13) no último cromossomo.

3. Objetivos

3.1 Gerais

O objetivo principal do estudo citogenético em tumores humanos é identificar e validar marcadores que possam ser úteis no diagnóstico e prognóstico, contribuindo para o entendimento das vias biológicas responsáveis pela transformação e progressão neoplásica, para a estratificação do tumor e orientação terapêutica, proporcionando um diagnóstico diferenciado.

3.2 Específicos

- Caracterizar morfológicamente os núcleos quanto ao grau de compactação, presença de micronúcleos e fragmentação apoptótica;
- Padronizar a metodologia FISH para a detecção de alterações cromossômicas numéricas em tumores de mama;
- Identificar e determinar o número de cópias dos cromossomos 8 e 17, utilizando sondas centroméricas, em núcleos interfásicos de células tumorais;
- Relacionar os resultados encontrados com o perfil anátomo-patológico dos tumores mamários;
- Comparar dados obtidos com outros descritos na literatura.

4. Materiais e Método

4.1 Abordagem Ética e Experimental

Este trabalho faz parte de um estudo maior intitulado: “Câncer de Mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob parecer 349/2005, e pelo CONEP, 027/2006.

As amostras tumorais foram obtidas de pacientes com câncer de mama, atendidas no Hospital Universitário/UFSC, e o estudo realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Centro de Ciências Biológicas (CCB) – UFSC.

4.2 Seleção das Pacientes

O grupo experimental foi composto por onze mulheres com diagnóstico de câncer de mama, não submetidas à tratamento quimioterápico. As cirurgias para remoção do tumor foram realizadas no Hospital Universitário/UFSC, durante o ano de 2007. As pacientes foram convidadas a participarem do estudo, firmando um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos I e II), autorizando a coleta de material biológico. Nesta ocasião, uma entrevista foi efetuada com o intuito de obter dados familiares e epidemiológicos, através de questionário estruturado (Anexo III). Os dados clínicos foram obtidos através de prontuários médicos.

4.3 Coleta de Material

Após procedimento cirúrgico para a retirada do tumor, amostras representativas da lesão neoplásica foram selecionadas pelo patologista responsável, antes de qualquer procedimento de preservação. Os fragmentos assim removidos foram coletados em microtubos devidamente identificados, contendo 1,5ml de meio de cultura RPMI 1640 – Sigma, e, em seguida,

encaminhados ao Laboratório de Citogenética do BEG/UFSC para processamento. O tamanho da amostra tumoral variou entre 0,4 e 0,8 cm.

4.4 Processamento das Amostras

No fluxo laminar, o tecido obtido foi disposto sobre uma Placa de Petri contendo 1ml de meio de cultura RPMI 1640, à temperatura ambiente, onde foi realizada uma dissociação mecânica, com o auxílio de agulha e bisturi. As amostras foram transferidas para um tubo de centrífuga cônico, descartando-se os fragmentos maiores.

4.5 Fixação das Células

Após enérgica ressuspensão, a amostra foi centrifugada à 1000 rpm durante 8 à 10min. Removido o sobrenadante, foram acrescentados 4ml de fixador Carnoy (metanol: ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente), recém preparado. Repetindo a centrifugação, o fixador foi renovado antes de compor a amostra final. O *pellet* foi ressuspenso com auxílio de pipeta *Pasteur* e, em seguida, gotejado em lâminas de microscopia (Knittel Glaser), previamente limpas.

4.6 Análise panorâmica dos núcleos interfásicos

As células tumorais foram coradas com HOECHST 33258 e os núcleos avaliados quanto ao grau de compactação, presença de micronúcleos e fragmentação apoptótica. A análise morfológica – 1000 núcleos de cada amostra – foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX-41, utilizando sistema de iluminação de vapor de mercúrio (HBO 100).

As imagens foram capturadas com câmera digital colorida refrigerada 3.3 mpixel QCOLOR3C (Qimaging), utilizando o programa Qcapture Pro 5.1 da QimagingTM.

4.7 FISH

Foram utilizadas sondas centroméricas alfa-satélites CEP 8 *SpectrumGreen* e CEP 17 *SpectrumOrange* (Vysis®). Estas sondas hibridaram regiões centroméricas específicas dos cromossomos (8p11.1-q11.1) e (7p11.1-q11.1), respectivamente. A codenaturação foi realizada a 75° C durante 1 minuto e, a hibridação a 42°C durante 30 minutos, em placa aquecida, utilizando adaptador *in situ* para Mastercycler® (Eppendorf). Após a hibridação foi realizado o procedimento rápido de lavagem (0,4X SSC / 0,3% NP 40 73±1°C 2 minutos, 2X SSC/ 0,1% NP 40 à temperatura ambiente, durante 1 minuto), após a secagem da lâmina no escuro foi realizada a contra-coloração, aplicando-se 10µl de DAPI I (Vysis®) sobre a lâmina, recoberta por lamínula.

4.8 Análise e Interpretação da FISH

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX-41, utilizando sistema de iluminação de vapor de mercúrio (HBO 100), com objetivas de 10X e 40X (para *scanning*) e 100X com imersão em óleo. Foram utilizados filtros U-MWU2 330-385 420 400 para visualização da cor azul (DAPI), U-MWG2 510-550 590 570 para a cor vermelha e U-MWB2 460-490 520IF 500 para a cor verde e filtro triplo (U-DM-DA/FI/TX2^{*3}) para a visualização das três cores simultaneamente.

Em cada amostra foi realizada a análise de, no mínimo, 100 núcleos interfásicos, não sobrepostos e aleatoriamente escolhidos na lâmina, enumerando-se os sinais fluorescentes. A amplificação foi, então, registrada com um valor absoluto.

As imagens representativas foram selecionadas e capturadas com câmera digital colorida refrigerada 3.3 mpixel QCOLOR3C (Qimaging), utilizando o programa Qcapture Pro 5.1 da QimagingTM.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização da Amostra

As amostras tumorais foram colhidas no ano de 2007 durante o procedimento cirúrgico, de acordo com a orientação clínica, incluindo a mastectomia (remoção de toda a mama) ou cirurgia conservadora (remoção apenas do tumor e de uma porção do tecido circunvizinho). Os tipos de cirurgia conservadora da mama incluíram a lumpectomia, na qual uma pequena quantidade de tecido normal circunvizinho é removida; a excisão ampla ou a mastectomia parcial; e a setorectomia (quadrantectomia).

Foram obtidas amostras de onze pacientes, todas do sexo feminino, com idades variando entre 36 e 78 anos, como apresentado na Tabela 01. A mediana das idades apresentou um valor de 57,18 anos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2008), a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco, com uma incidência relativamente rara antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária a média cresce rápida e progressivamente. O mesmo ocorreu no presente estudo (Figura 03), estando a idade modal entre 51 e 60 anos. Salientamos ainda a presença de mulheres jovens no grupo amostral, com 36 (paciente 74) e 37 (paciente 70) anos de idade.

De acordo com Amendola & Vieira (2005), se o diagnóstico ocorre entre 36 e 45 anos de idade a frequência de mutações nos genes BRCA1/2 pode variar entre 2,4% e 4,9% dos casos, aumentando para cerca de 13% quando associada a um parente de primeiro grau. Através de questionário estruturado (Apêndice III), a entrevista realizada demonstrou a ocorrência de outros tipos tumorais em parentes de primeiro grau da maioria das pacientes avaliadas, incluindo as mulheres jovens. As formas familiares do câncer de mama caracterizam-se, ainda, pelo aparecimento precoce, maior prevalência de bilateralidade e associação com outros tipos de tumores na mesma família, como o câncer de ovário e próstata (AMENDOLA & VIEIRA, 2005).

Existem também fortes evidências sugerindo uma morfologia específica para tumores em portadoras de mutações nos genes BRCA. O câncer de mama hereditário possui algumas diferenças biológicas interessantes quando comparado ao câncer esporádico. Em portadoras da mutação em BRCA1, uma grande proporção dos tumores exibe alto grau histológico, tende a ser

aneuplóide, apresenta geralmente altas taxas de células na fase S e em mitose e infiltrado linfocitário (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). Embora o desenvolvimento de tumores ao longo da vida dependa de fatores de risco variáveis, não se pode descartar totalmente a presença de predisposição genética nas amostras estudadas.

Tabela 01: Idade, altura, peso, índice de massa corporal, casos familiares de câncer em parentes de primeiro grau e o uso de terapias hormonais nas pacientes avaliadas.

Paciente	Idade	Altura	Peso	IMC	Casos familiares de câncer (1º Grau)	Tratamento hormonal
69	61	1,65	72,30	26,58	Sim	AC - 16 anos
70	37	1,56	66	27,16	Sim	RH - 6 anos
71	72	1,55	74	30,83	Sim	RH - 1 ano
72	60	1,56	64,8	26,66	Sim	AC - 15 anos
73	57	1,65	56	20,58	-	AC - 10 anos e RH
74	36	1,48	40	18,26	Sim	AC - 10 anos
76	56	1,65	66	24,26	Não	Não
77	55	1,43	64	31,37	Não	AC - 2 anos
78	78	1,62	61	23,28	Sim	AC - 5 anos
79	61	1,55	104	43,33	Sim	AC - 6 anos
93	56	-	-	-	-	-

*Pacientes que fizeram uso de anticoncepcional apresentam identificação (AC).

**Pacientes que fizeram outro tipo de TRH durante a menopausa foram identificadas com (RH).

***Critérios não encontrados apresentam (-).

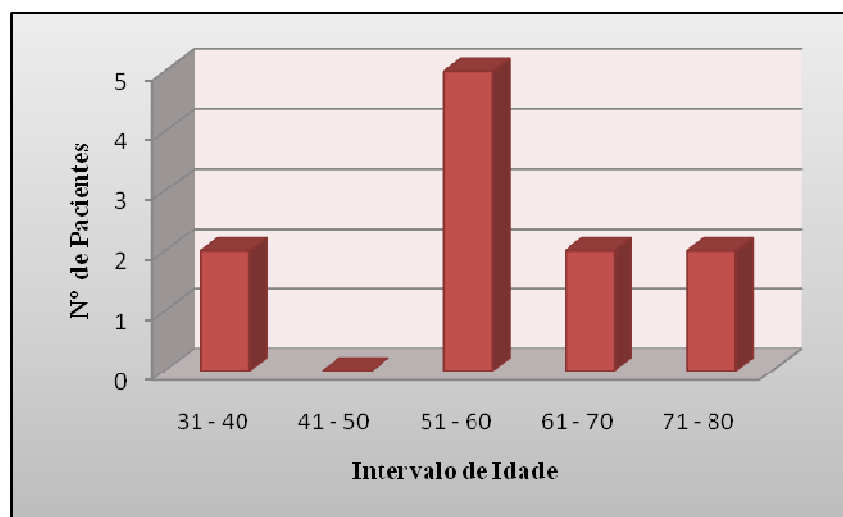


Figura 03: Incidência de câncer de mama de acordo com a idade das pacientes.

O índice de massa corporal (IMC), utilizado para avaliar o peso individual relativo, foi calculado ($\text{Peso} \div \text{Altura}^2$) em 10 pacientes e comparado a Tabela 02, segundo critérios simples usados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A média de IMC foi de $27,2 \text{ Kg/m}^2$. Entre as pacientes, uma apresentou IMC de $18,3 \text{ Kg/m}^2$, abaixo do peso ideal; três apresentam índice dentro da faixa considerada normal; outras três apresentaram IMC acima do ideal, indicando sobrepeso e, ainda, três apresentaram IMC superior a 30, indicando obesidade (Figura 04). Estudos prospectivos demonstraram que o risco de desenvolver câncer de mama aumenta em 30% em mulheres na pós-menopausa com IMC superior a 31 Kg/m^2 , comparado com mulheres com um IMC de aproximadamente 20 Kg/m^2 (CALLE *et al.*, 2003).

Tabela 02: Índice de Massa Corporal (OMS)

Cálculo IMC (Kg/m^2)	Situação
Abaixo de 18,5	Abaixo do peso
Entre 18,5 e 25,0	Peso normal
Entre 25,0 e 30,0	Acima do peso (sobrepeso)
Acima de 30	Obesidade

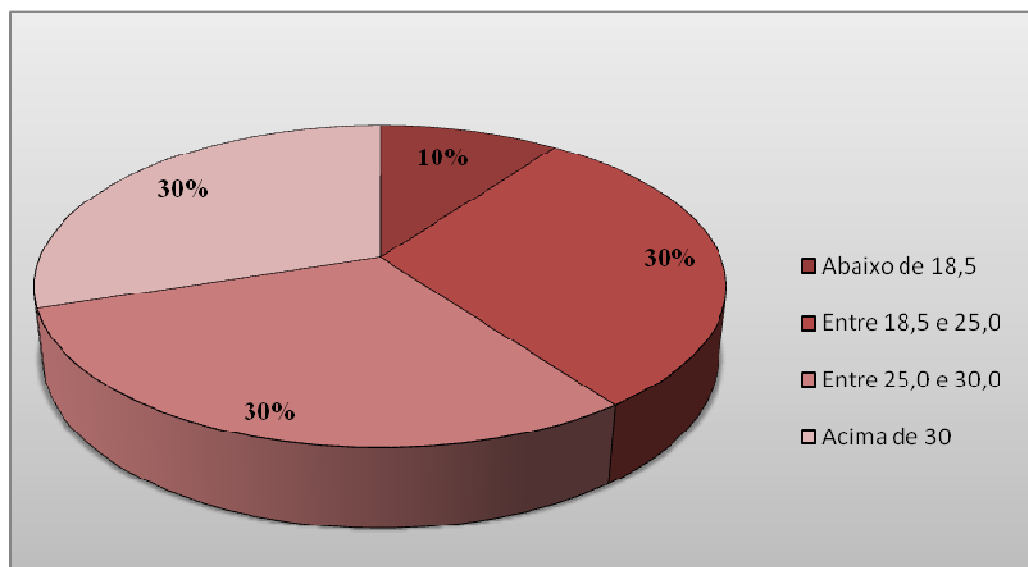


Figura 04: Proporção de pacientes abaixo do peso, dentro de seu peso ideal, com peso acima do ideal (sobrepeso) e considerado obesas.

Em relação ao uso de hormônios, obtivemos resposta em dez mulheres, entre estas, sete fazem ou fizeram uso de anticoncepcionais e três foram submetidas a tratamento de reposição hormonal durante a menopausa, durante período de tempo variável. Alguns estudos verificaram que o uso de anticoncepcionais aumenta o risco de desenvolvimento de câncer cervical, de mama e de pulmão, mas por outro lado é um agente protetor contra câncer endometrial e de ovário (IARC, 2007). O tratamento de reposição hormonal, no entanto, mostrou, em diversos estudos, ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (BILIMORIA & MORROW, 1995).

5.2 Resultado Anatomopatológico e Imunohistoquímico

A Tabela 03 apresenta a avaliação anátomo-patológica e imuno-histoquímica, realizada no Laboratório de Anatomia Patológica e Patologia Geral do HU-UFSC. A forma prevalente encontrada no grupo amostral foi de Carcinoma Ductal Invasivo, diagnosticado em 11 pacientes (100% das amostras). Do ponto de vista morfológico, tumores malignos da mama são também classificados em sua graduação histológica pelos critérios propostos por Bloom e Richardson e modificados por Elston e Ellis (1991), capazes de diminuir os problemas de reprodutibilidade e mostrar forte associação entre graus histológicos e o prognóstico. A avaliação do grau histológico nas amostras destas pacientes apresentou valores distintos classificados em três grupos: Baixo Grau/1, Grau Intermediário/2 e Alto Grau/3.

Os linfonodos foram caracterizados quanto à presença (Positivo) ou ausência (Negativo) de células tumorais, consideradas um indicador da disseminação hematogênica do tumor. Cinco pacientes apresentaram linfonodos positivos na cadeia linfática axilar, enquanto seis foram negativas na avaliação. A micrometástase é definida com o envolvimento no linfonodo sentinela focal < 2 mm e sua importância pode ser demonstrada em trabalhos recentes, relacionando sua detecção com uma piora da sobrevida (PAZ *et al.*, 2001).

A presença de metástases em linfonodos axilares aparece como fator isolado mais importante para definir o prognóstico do câncer de mama e representa a base de decisões terapêuticas. No entanto, outros estudos sugerem que o envolvimento de linfonodos pode não ser acurado para a detecção de disseminação hematogênica de células tumorais, nem a disseminação hematogênica está necessariamente associada ao acometimento de linfonodos, considerando a

presença de micrometástases em medula óssea uma avaliação mais fidedigna (BRAUN *et al.*, 2005).

Tabela 03: Diagnóstico Anátomo-Patológico e Imuno-histoquímica (IHQ) de neoplasias mamárias.

Paciente	ANÁTOMO-PATOLÓGICO			IHQ	
	Carcinoma	Grau	Linfonodos	c-erbB-2 (HER-2)	Receptor de estrogênio (ER)
69	Carcinoma Ductal Invasivo	2	Negativo	+2	Positivo
70	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Positivo	0	Negativo
71	Carcinoma Ductal Invasivo	1	Negativo	0	Positivo
72	Carcinoma Ductal Invasivo	1	Negativo	0	Positivo
73	Carcinoma Ductal Invasivo	1	Negativo	+2	Positivo
74	Carcinoma Ductal Invasivo	2	Positivo	x	x
76	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Negativo	0	Negativo
77	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Positivo	0	Positivo
78	Carcinoma Ductal Invasivo	x	Negativo	0	Positivo
79	Carcinoma Ductal Invasivo	3	Positivo	0	Positivo
93	Carcinoma Ductal Invasivo	2	Positivo	x	Positivo

*Os parâmetros não avaliados foram indicados com a letra (x).

Outro procedimento informativo para avaliar o estadiamento do tumor é a imuno-histoquímica. Esta metodologia é utilizada para detectar a expressão protéica do HER-2 pelo uso de anticorpos que reconhecem o domínio extracelular desta proteína, sendo também fundamental para a orientação terapêutica e determinação do prognóstico. Duas amostras, neste estudo, apresentaram expressão da proteína HER-2 com intensidade ligeira a moderada, em >10% das células neoplásicas (*score* +2).

A IHQ é habitualmente a primeira técnica a ser realizada, sendo possíveis os seguintes resultados (Figura 05): *score* 0 (ausência de marcação da membrana citoplasmática ou marcação <10% das células neoplásicas); *score* 1 (marcação incompleta e de intensidade discreta em >10% das células neoplásicas); *score* 2+ (marcação de intensidade ligeira a moderada, de toda a membrana em > 10% das células neoplásicas); *score* 3+ (marcação intensa de toda a membrana em > 10% das células neoplásicas). Os casos com *score* 0 e 1+ são considerados negativos. Os casos 3+ são positivos, sendo os doentes elegíveis para a terapêutica com trastuzumab. Os casos

2+ necessitam de avaliação subsequente por FISH que determinará se são positivos (com amplificação do gene) ou negativos (sem amplificação do gene), sendo apenas os casos positivos candidatos para a terapêutica com trastuzumab (ANDRÉ *et al.*, 2005).

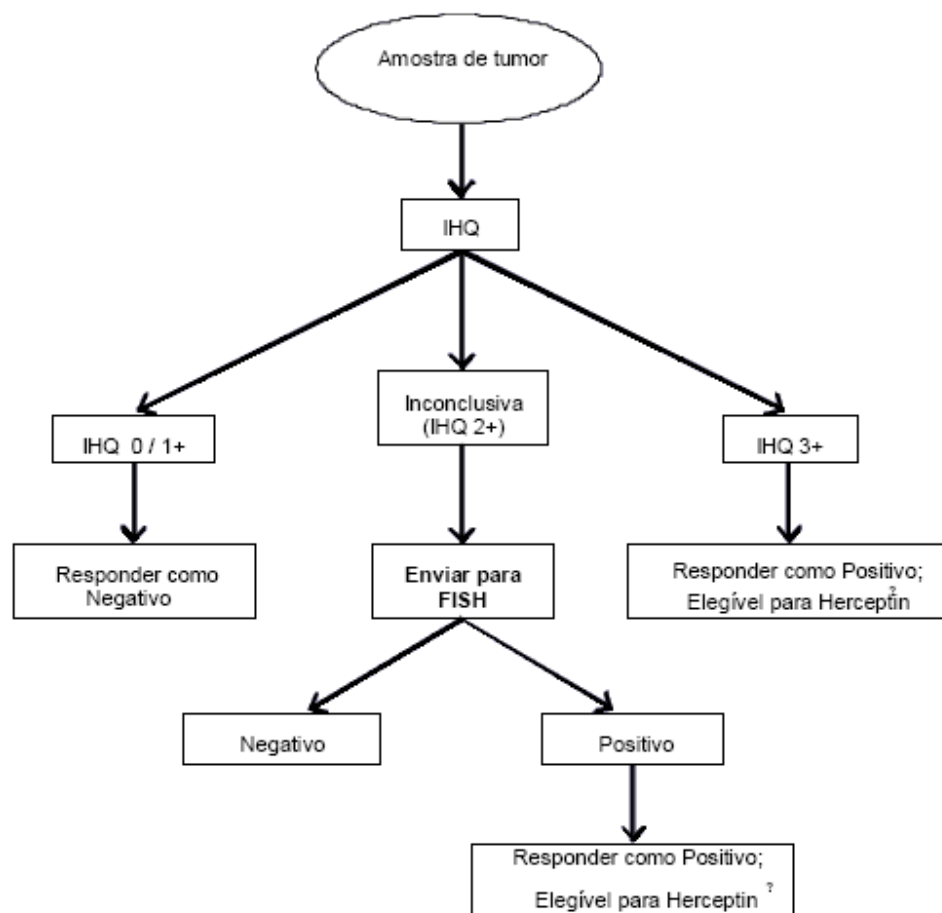


Figura 05: Possíveis resultados imunohistoquímicos na amplificação da proteína HER-2.

A amplificação do gene de fator de crescimento epidermal humano (HER-2) e/ou a superexpressão da proteína HER-2 vem sendo associada com o mau prognóstico tanto em tumores mamários com linfonodos positivos quanto negativos (HYUN *et al.*, 2008). No carcinoma de mama invasivo, a superexpressão e/ou amplificação do gene HER-2, foi detectada em 15% a 30% dos casos, (ANDRÉ *et al.*, 2005). O mesmo ocorre nas amostras avaliadas, sendo duas das nove amostras analisadas positivas para a expressão da proteína HER-2.

Em relação ao receptor de estrogênio (ER), a avaliação foi realizada em 10 das 11 amostras, sendo oito positivas e duas negativas. Nas amostras das pacientes acima de 50 anos de idade, foi detectada a positividade para o receptor de estrogênio em 8 das 9 amostras (88,88%) confirmando dados da literatura. De acordo com Payne *et al.* (2008), aproximadamente 80% das mulheres acima de 50 anos apresentam tumores positivos para o receptor de estrogênio.

O ER é considerado o marcador mais eficiente para estratificação de tumores mamários, utilizado para a caracterização do prognóstico e orientação de terapias hormonais, conferindo uma implicação terapêutica significativa. O ER constitui um fator importante no processo carcinogênico e sua inibição, através de alvos endócrinos, pode ocorrer diretamente usando agonistas do estrogênio (moduladores seletivos do receptor de estrogênio) ou indiretamente bloqueando a conversão de andrógenos do estrogênio, constituindo preditivos essenciais em terapias adjuvantes do câncer de mama (PAYNE *et al.*, 2008).

No câncer de mama a presença de marcadores específicos vem sendo utilizada rotineiramente para orientação de respostas terapêuticas e tratamentos específicos. Contudo, até o momento, três marcadores moleculares são utilizados na patologia clínica para câncer de mama: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PGR) e o receptor de fator de crescimento epidermal (HER-2). Eles são fundamentais para categorizar tumores em diferentes grupos combinando informações como tamanho tumoral, grau histológico, invasão linfática de células tumorais e estágio nodular (PAYNE *et al.*, 2008).

5.3 Avaliação dos Núcleos Interfásicos

As alterações nucleares destacam-se entre as alterações morfológicas presentes nas células tumorais, incluindo variações na forma e tamanho do núcleo, no número e tamanho dos nucléolos e na textura da cromatina. Essas alterações podem contribuir para a caracterização do tipo tumoral e do estadiamento da doença, como também esclarecer alterações funcionais das células neoplásicas. No entanto, é difícil compreender uma relação entre a morfologia nuclear e o fenótipo maligno, tendo em vista que características da organização nuclear apresentam significado funcional pouco conhecido (ZYNK *et al.*, 2004). Avanços consideráveis, no entanto,

vem sendo estabelecidos, sugerindo a incorporação de novos critérios para o diagnóstico e desenvolvimento de terapias antitumorais

Numa primeira etapa deste trabalho, os núcleos foram analisados quanto ao grau de compactação, presença de micronúcleos e fragmentação apoptótica. Os núcleos interfásicos (1.000) foram avaliados morfológicamente sendo atribuídos valores inteiros (Tabela 04), de acordo com os critérios anteriormente sugeridos. Esta abordagem foi utilizada como alternativa à avaliação citogenética tradicional que é tecnicamente limitada.

Tabela 04: Núcleos apoptóticos, micronúcleos, grau de compactação nuclear e aneuploidia.

Amostra	Apoptose /1000 cels	Micronúcleo /1000 cels	Proporção de Núcleos Blásticos	FISH (Aneuploidia)	
				CEP 8	CEP 17
69	-	12	3/1		
70	2	15	1/1	96%	
71	-	22	1/40		
72	-	2	1/30		
73	-	13	1/5		
74	11	13	1/4		
76	9	192	1/40	95%	20%
77	-	14	1/40	97%	24%
78	2	3	1/40		
79	-	-	-		
93	1	7	1/10		

*Não foram encontrados resultados nas amostras identificadas com (-).

**Espaços em branco não foram avaliados.

As células cancerosas têm origem clonal, embora vários clones distintos possam estar presentes num mesmo tumor, por diferentes origens ou por divergência ao longo das mitoses sucessivas que ocorrem. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrolo da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose, dois principais mecanismos patogênicos do câncer (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Neste estudo, a fragmentação apoptótica foi caracterizada pela morfologia nuclear, associada à condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos. A Tabela 04 apresenta a frequência dessas células identificadas nas amostras. Embora existam metodologias mais acuradas, utilizando biomarcadores específicos para a detecção de fragmentação

internucleossomal na identificação do perfil apoptótico de populações celulares (HIPFNER & COHEN, 2004), a abordagem utilizada encontrou uma baixa frequência (Figura 06) do processo nas amostras avaliadas. Este fato pode estar associado à resistência terapêutica, fornecendo indícios de que esta avaliação pode contribuir para a caracterização do tumor.

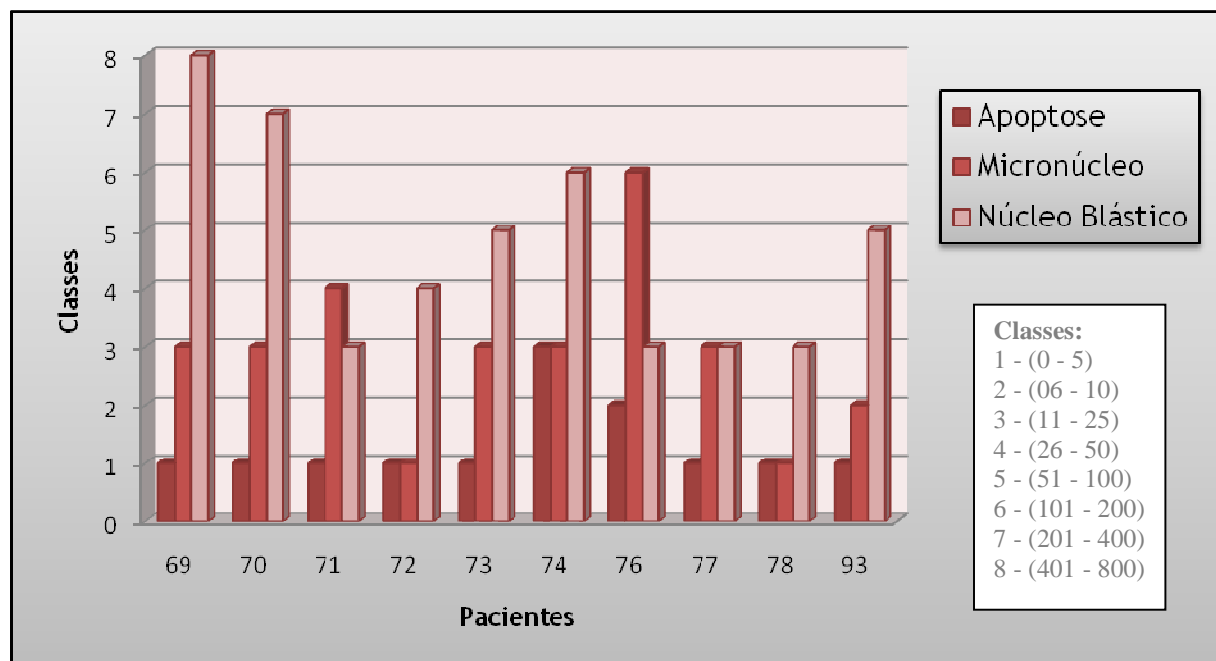


Figura 06: Frequência de núcleos blásticos, corpos apoptóticos e micronúcleo encontrados em cada amostra avaliada.

Os micronúcleos (MN) são identificados na intérfase e se apresentam na forma de pequenos corpúsculos citoplasmáticos (Figura 07). Correspondem a fragmentos acêntricos resultantes de deleções cromossômicas ou cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase da divisão celular. A contagem de micronúcleos é considerada importante para a caracterização da instabilidade cromossômica (GEIGL *et al.*, 2008).

Neste estudo a amostra 76 apresentou um valor discrepante, sendo detectadas 192 células com a presença de um ou mais MN associado. A contagem de micronúcleos apresenta uma importância relevante para a caracterização do diagnóstico de instabilidade cromossômica

(GEIGL *et al.*, 2008). Salienta-se, no entanto, que a metodologia utilizada não foi a mais indicada para esta avaliação, podendo parte destas alterações serem decorrentes de artefatos de técnica.

Foram considerados núcleos blásticos (NB) aqueles com tamanho maior que o usual, arredondados e apresentando cromatina frouxa (Figura 08). As amostras analisadas apresentaram heterogeneidade quanto ao grau de compactação nuclear, sendo expressa a proporção entre núcleos blásticos e normais, respectivamente. No presente estudo a amostra 69 apresentou uma proporção elevada de núcleos blásticos (NB), com uma relação de três núcleos blásticos para cada núcleo normal. Os NB são comuns em células que apresentam proliferação intensa, fornecendo informações adicionais sobre o potencial proliferativo das células tumorais avaliadas. A amostra 79 não se mostrou significativa na avaliação por apresentar-se compacta e de difícil dissociação durante a fragmentação mecânica do tumor.



Figura 07: Presença de micronúcleos avaliados na amostra 76.

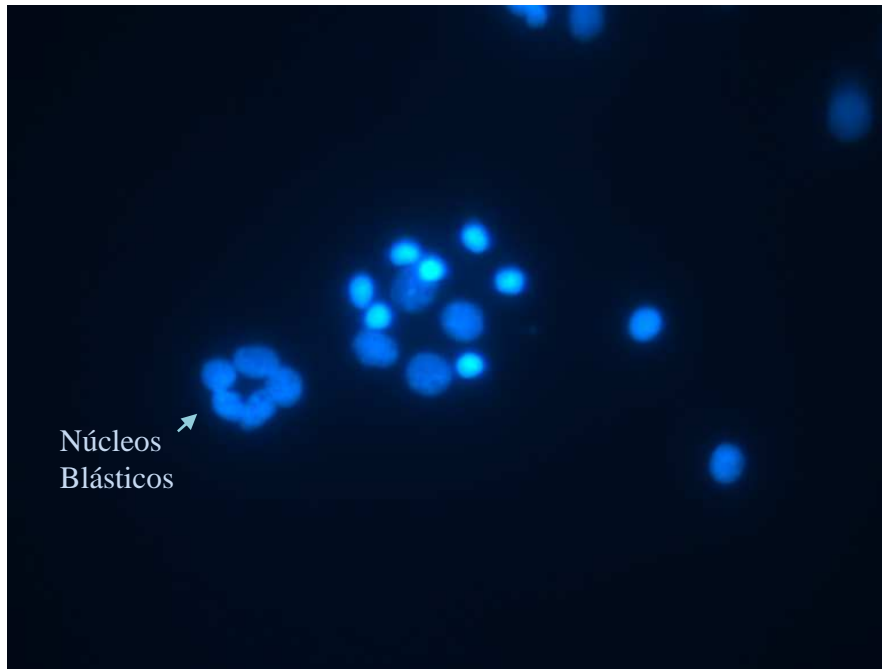


Figura 08: Presença de núcleos blásticos avaliados na amostra 69.

5.5 Citogenética Molecular – FISH

A primeira hipótese, considerando a origem do câncer em relação à genética celular, foi proposta por Boveri em 1914. Este autor admitiu que a causa do comportamento anormal era inerente à célula tumoral e não ao meio ambiente e que o desenvolvimento tumoral se originaria a partir de uma única célula. Boveri sugeriu que a alteração da constituição cromossômica poderia conferir as propriedades da célula neoplásica. No entanto, por falta de metodologia adequada esta hipótese não pode ser confirmada pelo autor (BOVERI, 2008).

A primeira observação de uma alteração cromossômica em célula tumoral foi feita por Nowell & Hungerford em 1960, quando constatarem na leucemia mielóide crônica a presença de um pequeno cromossomo acrocêntrico denominado cromossomo “Philadelphia”. Com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico houve um rápido progresso da citogenética tumoral detectando-se alterações específicas em leucemias e linfomas. O estudo em tumores sólidos, no

entanto, foi mais lento devido às dificuldades em se conseguir culturas celulares adequadas para a obtenção de metáfases, sendo freqüente a seleção “*in vitro*” (BOVERI, 2008).

Paralelamente aos defeitos cromossômicos específicos, as células tumorais apresentam alterações numéricas e estruturais, sendo que grande parte representam eventos secundários ao processo neoplásico, evidenciando que as alterações genéticas relatadas em tumores esporádicos são muitas vezes confusas, contraditórias, não confirmadas e complexas (LOURO *et al.*, 2002). Algumas destas alterações parecem estar associadas com o prognóstico da doença, mas estudos mais abrangentes precisam ser realizados para corroborar as conclusões descritas de maneira esparsa na literatura científica (LOURO *et al.*, 2002).

Tumores histologicamente mais agressivos apresentam um maior número de alterações genéticas (CHENG *et al.*, 1996). Novas abordagens técnicas, como a utilização da metodologia FISH, possibilitaram a caracterização de alguns parâmetros citogenéticos diretamente em núcleos interfásicos, especialmente a enumeração de cópias de cromossomos específicos. A acurácia desta avaliação é influenciada diretamente pela morfologia dos núcleos, que muitas vezes se apresenta inadequada, e pelo número de células analisadas (VARELLA-GARCIA *et al.*, 2004).

No presente estudo houve a padronização da metodologia FISH para avaliação de núcleos interfásicos obtidos de amostras tumorais. Nos cromossomos avaliados localizam-se os oncogenes c-MYC (8q24), HER-2 (17q21) e o gene supressor tumoral TP53 (17p13) (Figura 09), podendo haver uma associação entre a alteração do número de cópias desses cromossomos e a agressividade do tumor, decorrente do desequilíbrio no funcionamento destes genes.

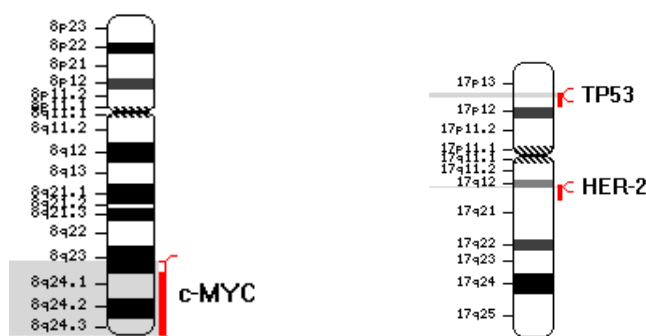


Figura 09: Cromossomos avaliados quanto amplificação da região centromérica.

(Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov)

Em núcleos interfásicos de células normais, dois sinais de cada sonda devem ser observados. Mais de duas marcações no núcleo indicam ganho cromossômico e, no caso de apenas uma sinalização, a monossomia (Tabela 05). A falta de sinal deve ser interpretada com cautela, pois pode refletir efetivamente a falta do cromossomo, ou ser decorrente de uma falha na hibridação.

Tabela 05: Quantidade de sinais amplificados em 100 núcleos interfásicos.

AMOSTRA/ Nº SINAIS		0	1	2	3	4	5	6	7
70	Cromossomo 8	0	0	4	33	41	17	3	2
	Cromossomo 17	-	-	-	-	-	-	-	-
76	Cromossomo 8	0	1	5	88	6	0	0	0
	Cromossomo 17	0	14	80	6	0	0	0	0
77	Cromossomo 8	0	0	3	15	62	8	0	2
	Cromossomo 17	0	19	76	2	3	0	0	0

Heselmeyer-Haddad *et al.* (2002) realizaram um estudo com o uso de sondas correspondentes ao braço longo do cromossomo 1, genes c-MYC, HER-2 e TP53, e centrômero dos cromossomos 8, 10 e 17, em amostras de punções mamárias, concluindo que esta avaliação foi suficiente para o diagnóstico do câncer de mama em 100% das amostradas testadas, independente de qualquer outro parâmetro utilizado.

Os resultados obtidos na amostra 70 evidenciaram alteração no número de cópias do cromossomo 8, detectando a polissomia em 96% das células analisadas, sendo 41% dessas tetrassomias. Estas células, não apresentaram marcação correspondente ao cromossomo 17 nos núcleos interfásicos podendo, este resultado, ser decorrente de artefatos da técnica ou refletir a ausência deste cromossomo.

Na amostra 76 o número de cópias do cromossomo 8 variou entre 1 e 4, assumindo valores de aneuploidia em 95% das células, sendo 88% trissômicas. Na mesma amostra, foi detectada a presença de sinais fluorescentes, correspondentes ao centrômero do cromossomo 17 (Figura 10), estando o número de cópias anormal em 20 dentre os 100 núcleos analisados, 14 desses evidenciando a monossomia.

A aneuploidia do cromossomo 8 na amostra 77 foi observada em 97% do núcleos, quase a totalidade das células analisadas, sendo 62 delas tetrassômicas. Esta amostra apresentou ainda 24% das suas células alteradas numericamente quanto à presença e/ou ausência do cromossomo 17, sendo 19% monossômicas (Figura 11). A visualização dos sinais pôde ser melhor interpretada com a sobreposição das imagens capturadas, apresentadas nas Figuras 12 e 13, das amostras 76 e 77, respectivamente.

Considerando os diferentes tumores avaliados neste estudo, foi observada a polissomia do cromossomo 8 em 287 (95,66%) dos 300 núcleos avaliados, sendo a monossomia encontrada em apenas um núcleo (amostra 76). Estudos similares sugerem que a trissomia/tetrassomia deste cromossomo acarreta a amplificação do oncogene c-MYC nas células tumorais de carcinomas mamários. Além de aneuploidia, a amplificação do gene c-Myc no câncer de mama também pode ocorrer na forma de “*double minutes*” (DM) e regiões homogeneamente coradas (HSR) (HESELMAYER-HADDAD *et al.*, 2002).

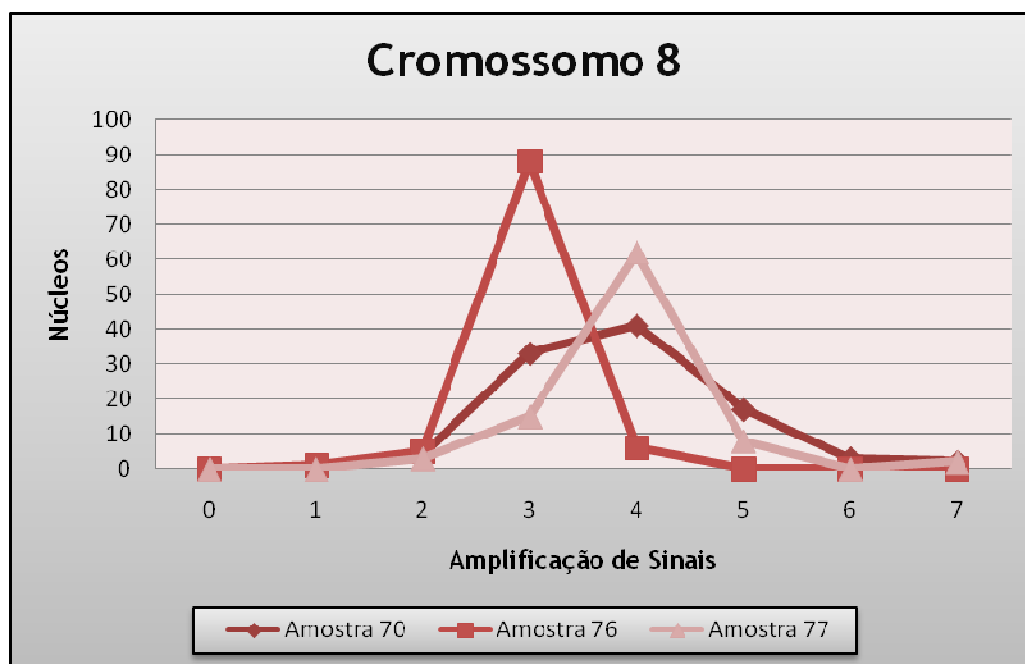


Figura 10: Amplificação da região centromérica do cromossomo 8, nas amostras 70, 76 e 77.

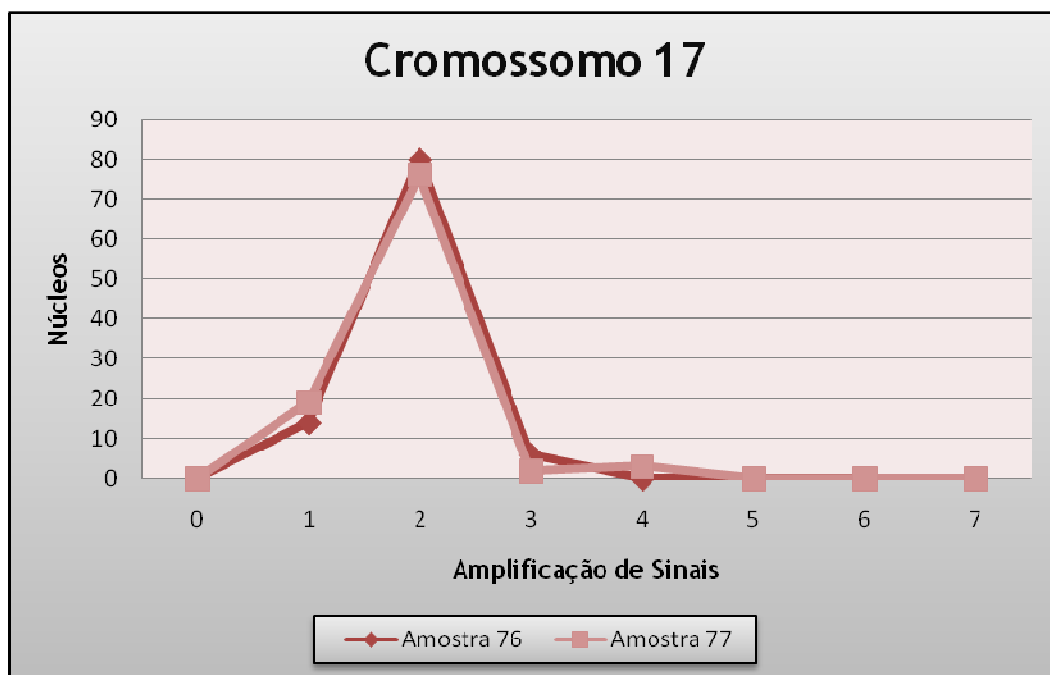


Figura 11: Amplificação da região centromérica do cromossomo 17, na amostras 76 e 77.

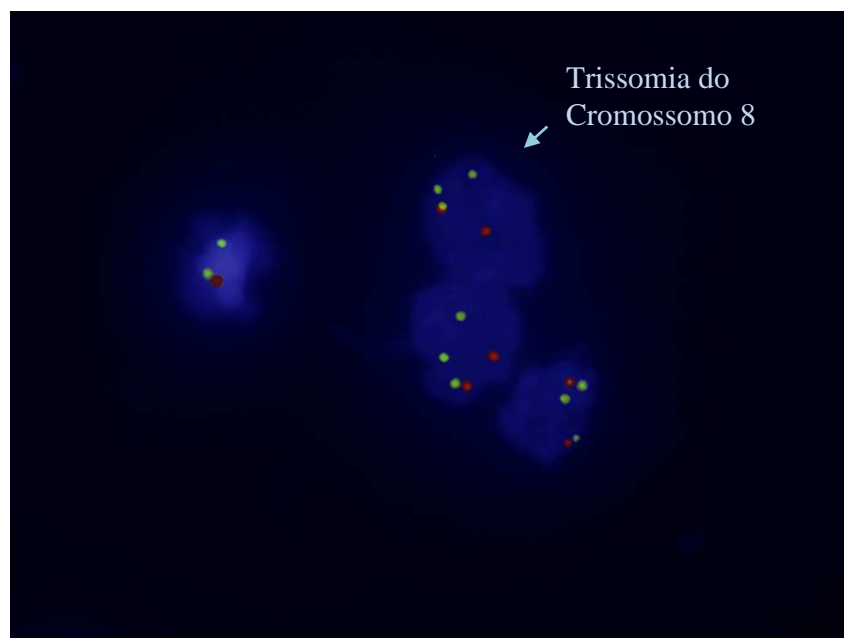


Figura 12: Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 76.
(CEP 8 - *SpectrumGreen* e CEP 17 *SpectrumOrange*)



Figura 13: Imagem da FISH em célula tumoral mamária da amostra 77.
(CEP 8 - *SpectrumGreen* e CEP 17 *SpectrumOrange*)

Em relação ao cromossomo 17 a monossomia foi detectada nas duas amostras avaliadas, correspondendo a 33 (16,5%) dos 200 núcleos avaliados, enquanto a polissomia apareceu em apenas 11 (5,5%) núcleos, ao contrário do verificado em outros estudos similares, sugerindo ainda a nulissomia na amostra 70. Hyun *et al.* (2008) numa revisão da literatura, verificaram a ocorrência de polissomia do cromossomo 17 entre 10,3% a 48,7% das células de tumores mamários analisados. O aumento no número de cópias do cromossomo 17 resultaria no aumento de cópias do gene HER-2 o que pode conduzir a superexpressão da proteína HER-2 em tumores mamários, sem que haja necessariamente a amplificação gênica (HYUN *et al.*, 2008).

Estudos comparativos com imunohistoquímica (IHQ) e FISH tem apresentado um alto grau de concordância (HYUN *et al.*, 2008). Resultados utilizando a técnica de FISH, no entanto, é considerado universal nos tumores em que a marcação é equívoca ou não interpretável, assim como naqueles em que se verifica marcação completa da membrana citoplasmática, com intensidade ligeira a moderada (*score* 2+), uma vez que se considera que destes, apenas os casos

que evidenciem amplificação (positivos por FISH) respondem à terapêutica. Estudos recentes defendem que a técnica de FISH deve também ser utilizada nos casos com *score* 3+, pelo fato de 10-12% destes não demonstrarem amplificação (ANDRÉ *et al.*, 2005).

A super-expressão do gene HER-2, encontrada em 20-30% dos casos de câncer de mama, está associada a um mau prognóstico, com baixa sobrevivência e pouca resposta terapêutica (VARELLA-GARCIA, 2003), sendo importante parâmetro para o uso da droga Herceptin®, eficaz somente nas que apresentam a superexpressão da proteína. Arpino *et al.* (2004) e Come *et al.* (2006) relataram que o nível de expressão aumentada do HER-2 está associado com a resistência ao tamoxifen.

A superexpressão da proteína HER-2 vem sendo atribuída a amplificação do gene em aproximadamente 90% dos casos. Isso sugere que a superexpressão do gene ocorre devido ao aumento no número de cópias do gene HER-2 e, de modo secundário, pela polissomia do cromossomo 17 (HYUN *et al.*, 2008). A utilização de novos testes moleculares orienta estratégias individuais, fundamentadas no perfil genético do tumor de cada paciente, e quando associadas a terapias-alvo tornam os tratamentos mais eficazes e ampliam a expectativa clínica das pacientes.

Embora a amplificação do gene HER-2 possa diferir substancialmente pelo tamanho, facilitando a sua identificação, pelo menos outros dois genes presentes em regiões do cromossomo 17, GRB7 e MLN, podem estar envolvidos no potencial oncogênico e contribuir para a tumorigênese de forma independente ou associada à expressão do HER-2. Na linha desta hipótese, a superexpressão do GRB7 vem sendo demonstrada em pesquisas recentes e relacionada ao mau prognóstico em tumores mamários, mesmo com ausência da amplificação do HER-2 (VANDEN BEMPT *et al.*, 2007).

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea. O aumento da compreensão da biologia deste câncer levou a avanços clínicos no seu tratamento, principalmente na melhoria de sistemas de rastreamento, como a mamografia, e no tratamento da doença ainda em estágio precoce. A triagem de marcadores prognósticos moleculares confiáveis para se estimar o risco de recorrência e progressão tumoral é lógica e de grande importância, contribuindo para as decisões a respeito de terapias adjuvantes e no tratamento pós-operatório.

5.5 Problemas com a Metodologia FISH

A introdução da hibridação “*in situ*” por fluorescência representou uma evolução para a citogenética, fazendo uma ponte entre a análise puramente citológica e a direta do DNA, contudo a utilização do FISH na abordagem citogenética de tumores sólidos apresenta ainda consideráveis limitações. Uma das restrições decorre do custo elevado dos insumos, como equipamentos e reagentes, que conferem uma restrição real a utilização da técnica na rotina prática laboratorial.

A análise da coloração fluorescente é realizada em microscópio de fluorescência equipado com lâmpada ultravioleta e um conjunto de filtros que permitem selecionar o comprimento de onda de máxima excitação do corante e máxima emissão de luz. A necessidade desses equipamentos sensíveis e de alto custo, bem como de um sistema de captura de imagens adequado, constituem fatores essenciais para a acurácia da análise, sendo ainda a manutenção e o cuidado dispendiosos financeiramente.

As sondas comerciais utilizadas que apresentam alta reprodutibilidade e eficiência apresentam um custo excessivamente elevado, tornando-as inacessíveis para utilização de rotina. A produção artesanal de sondas, no entanto, dificilmente confere a reprodutibilidade ideal, sendo necessária uma padronização para cada experimento realizado. Outra desvantagem da FISH interfásica consiste na limitação do número de sondas que podem ser usadas simultaneamente na análise. Ainda, uma infra-estrutura laboratorial para manejo adequado de reagentes e soluções, somada a essa criteriosa metodologia, podem limitar a realização da pesquisa que requer uma padronização cautelosa durante os procedimentos e utilização de protocolos adequados.

Este trabalho proporcionou a oportunidade de familiarização com a metodologia, porém o sucesso na sua aplicação não foi o esperado, sugerindo a necessidade de uma melhor padronização e continuidade na avaliação das amostras. Ainda, a experiência adquirida, uma vez que a análise utilizando fluorescência requer agilidade e precisão pelo rápido desaparecimento dos sinais fluorescentes e, ainda, conhecimento prévio para a interpretação efetiva dos núcleos interfásicos sinalizados.

5.6 Considerações Finais

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea. O aumento da compreensão da biologia deste câncer levou a avanços clínicos no seu tratamento, principalmente na melhoria de sistemas de rastreamento, como a mamografia, e no tratamento da doença ainda em estágio precoce. A triagem de marcadores prognósticos moleculares confiáveis para se estimar o risco de recorrência e progressão tumoral é lógica e de grande importância, contribuindo para as decisões a respeito de terapias adjuvantes e no tratamento pós-operatório.

A caracterização de novos testes moleculares delineia estratégias individuais, tendo como base o perfil genético do tumor de cada paciente, e quando associadas à terapias-alvo tornam os tratamentos mais eficazes e ampliam a expectativa clínica das pacientes. Pesquisas futuras e estudos citogenéticos mais detalhados sobre a instabilidade cromossômica deverão contribuir para a descoberta de eventos iniciais da tumorigênese, bem como estabelecer a função exata da instabilidade cromossômica na iniciação e progressão tumoral. Sendo assim, a pesquisa com células tumorais exige o empenho de uma equipe multidisciplinar, incluindo cirurgiões, patologistas e citogenetecistas.

Estudos epidemiológicos também apresentam importante relevância para a compreensão da susceptibilidade genética e da interação entre os fatores genéticos e ambientais, sendo fundamentais para esclarecer novos aspectos sobre a etiologia dos cânceres humanos. Estudos mais abrangentes, envolvendo um número maior de pacientes e controles, poderão estabelecer possíveis associações com eventos reprodutivos que alteram níveis hormonais ao longo da vida, hábitos alimentares e estilo de vida, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de procedimentos mais eficazes na prevenção e no tratamento do câncer de mama, responsável por uma ponderável morbidade e mortalidade na população.

6. Conclusões

- Os resultados preliminares não permitiram estabelecer uma relação clara entre os parâmetros avaliados, embora individualmente possam fornecer subsídios para a caracterização da patogênese e melhor estratificação do tumor.
- A variabilidade celular e molecular observada caracterizaram a heterogeneidade dos tumores avaliados, enfatizando a importância de se estudar as múltiplas alterações genéticas potencialmente envolvidas com o câncer de mama.
- A quantidade de núcleos blásticos encontrado forneceu informações adicionais sobre o potencial proliferativo das células das amostras estudadas.
- A contagem de micronúcleos apresentou uma importância significativa para a caracterização do diagnóstico de instabilidade cromossômica em tumores mamários.
- Fragmentos apoptóticos encontrados não apresentaram valores expressivos no estudo.
- Foi padronizada a metodologia de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH), associada à dinâmica de análise ao microscópio de epifluorescência e interpretação dos resultados.
- A alta sensibilidade com que se pode avaliar a agressividade dos tumores justifica a aplicabilidade de sondas centroméricas específicas como alvo importante na detecção de aneuploidias que levam a instabilidade genética.
- Os resultados evidenciaram a aneuploidia do cromossomo 8 em 95,66% dos núcleos analisados, sugerindo uma alta frequência da amplificação do oncogene c-MYC nas células tumorais dos carcinomas mamários estudados.
- A associação entre o número de cromossomos 17 encontrado e a superexpressão do gene HER-2 não pode ser avaliada neste estudo. No entanto, faz-se necessário transmitir que FISH, como método de determinação da amplificação deste gene no carcinoma da mama, é uma técnica rigorosa e confiável, que corrobora vários outros

estudos e permite distinguir com segurança os casos em relação aos quais a terapêutica com trastuzumab (Herceptin®) é potencialmente eficaz.

- Novos estudos precisam ser realizados objetivando um melhor conhecimento sobre as bases genéticas e moleculares do câncer de mama.

7. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3^a ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 2004.

AMENDOLA, L.C.B. & VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.

ANDRÉ, S.; TOMÁS, A.R.; FONSECA, R. CARCINOMA DA MAMA Determinação da Amplificação do HER2 por Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH). **Acta Med Port**, v. 18, p. 417-422, 2005.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics Supplement**, v. 33, p. 238-247, 2003.

BILIMORIA, M.M.; MORROW, M. The Woman at Increased Risk for Breast-Cancer - Evaluation and Management Strategies. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 45, p. 263-278, 1995.

BOVERI, T. Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and Annotated by Henry Harris, **Journal of Cell Science**, v. 121, Supplement 1, p. 1-84, 2008.

BRAUN, S.; VOGL, F.D.; NAUME, B.; JANNI, W.; OSBORNE, M.P.; COOMBES, R.C.; SCHLIMOK, G.; DIEL, I.J.; GERBER, B.; GEBAUER, G.; PIERGA, J.Y.; MARTH, C.; ORUZIO, D.; WIEDSWANG, G.; SOLOMAYER, E.F.; KUNDT, G.; STROBL, B.; FEHM, T.; WONG, G.Y.C.; BLISS, J.; VINCENT-SALOMON, A.; PANTEL, K. A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *The new england journal of medicine*, v. 353, n. 8, p. 793-802, 2005.

CALLE, E.E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. **N Engl J Med**, p. 348-1625, 2003.

CHENG, P.C.; GOSEWEHR, J.A.; KIM, T.M.; VELICESCU, M.; WAN, M.; ZHENG J.; FELIX, J.C.; COFER, K.F.; LUO, P.; BIELA, B.H., GORDOV, G.; DUBEAU, L. Potencial role of the inactivated X chromossomes in ovarian epithelial tumor development. **J Natl Cancer Institute**, p. 88-510, 1996.

COLLINS, J.A.; BLAKE, J.M.; CROSIGNANI, P.G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 6, p. 545-560, 2005.

DOMINGUEZ-SOLA, D.; YING, C.Y.; GRANDORI, C.; RUGGIERO, L.; CHEN, B.; LI, M.; GALLOWAY, D.A.; GU, W.; GAUTIER, J.; DALLA-FAVERA, R. Non-transcripcional control of DNA replication by c-Myc. **Nature**, v. 448, p. 445-453, 2007.

DUESBERG, P.; LI R.H., *et al.* The chromosomal basis of cancer. **Cellular Oncology**, v. 27, n. 5-6, p. 293-318, 2005.

DUESBERG, P. Chromosomal chaos and cancer. **Scientific American**, v. 296, n. 5, p. 52-59, 2007.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer, experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 10, p. 19:403, 1991.

Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

GEIGL, J.B.; OBENAUF, A.C.; SCHWARZBRAUM, T.; SPEICHER, M.R. Defining 'chromossomal instability'. **Cell Press**, v. 4, n. 2, p. 64-69, 2008.

GLANZ, K. Behavioral research contributions and needs in cancer prevention and control: Dietary change. **Prev Med**, v. 26, p. 43-55, 1997.

GOLDSCHIMIDT, R.A. Histopathology of Breast Malignant Disease. Atlas of Clinical Oncology. American Cancer Society, p. 89-98, 2000.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C.K.; MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer** v. 37, n. 8, p. 948-65, 2001.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HABER, D.A.; FEARON, E.R. The promise of cancer genetics. **Lancet**, v. 351, p. 1-8, 1998.

HANKINSON, S.E., WILLETT, W.C., MANSON, J.E., *et al.* Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 1297, 1995.

HEDENFALK, I.; RINGNE, M.; BEN-DOR, A.; YAKHINI, Z.; CHEN, Y.; CHEBIL, G.; ACH, R.; LOMAN, N.; OLSSON, H.; MELTZER, P.; BORG, A.; TRENT, J. Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. **PNAS**, v. 100, n. 5, p. 2532-2537, 2003.

HENDERSON, B.E; FEIGELSON, H.S. Hormonal Carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427-433, 2000.

HESELMAYER-HADDAD, K.; CHAUDHRI, N.; STOLTZFUS, P.; CHENG, J.C.; WILBER, K.; MORRISON, L.; AUER, G.; RIED, T. Detection of Chromosomal Aneuploidies and Gene Copy Number Changes in Fine Needle Aspirates Is a Specific, Sensitive, and Objective Genetic Test for the Diagnosis of Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 62, p. 2365-2369, 2002.

HIPFNER, D.R.; COHEN, S.M. Connecting proliferation and Apoptosis in Development and disease. **Nature Reviews**, v. 5, p. 805-815, 2004.

HUGO Gene Nomenclature. Disponível em <www.genenames.org> Acessado em 21 de junho de 2008.

HYUN, C.L.; LEE, H.E.; KIM, K.S.; KIM, S-W; KIM, J.H.; CHOE, G.; PARK, S.Y. The effect of chromosome 17 polysomy on HER2/neu status in breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 61, p. 317-321, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em <www.inca.gov.br> Acessado em 10 de maio de 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER (IBCC). Disponível em <www.ibcc.org.br> Acessado em 09 de junho de 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Disponível em <www.iarc.fr> Acessado em 08 de junho de 2007.

JOHNSON-THOMPSON, M.C.; GUTHRIE J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, p. 9-1224, 2000.

JOHNSON, K.C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 619-628, 2005.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A.; TRAVIS, R. C. Nutrition and Breast Cancer. **The Breast**, v. 12, p. 412-416, 2003.

KOPS, G.J.P.L.; WEAVER B.A.A., *et al.* On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 10, p. 773-785, 2005.

LASH, T.L.; ASCHENGRAU, A. Alcohol drinking and risk of breast cancer. **The Breast Journal**, v. 6, n. 6, p. 396-399, 2000.

LEE, W.L.; CHENG, M.H.; CHAO, H.T.; WANG, P.H. The Role of Selective Estrogen Receptor Modulators on Breast Cancer: From Tamoxifen to Raloxifene. **Taiwan Journal of Obstet Gynecol**, v. 47, n. 1, p. 24-31, 2008.

LINGLE, W.L.; BARRETT S.L., *et al.* Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 4, p. 1978-1983, 2002.

LOURO, I.D.; LLERENA JR., J.C.; VIEIRA DE MELO, M.S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**, 2^a ed., São Paulo, MSG Produção Editorial, 2002.

MARCHBANKS, P.A.; MCDONALD, J.A.; WILSON, H.G.; *et al.* Oral contraceptives and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 2025, 2002.

MERCK SHARP & DOHME (MSD). Disponível em < www.msd-brazil.com > Acessado em 08 de junho de 2008.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MANDAHN, N.; MERTENS, F. Clinical Significance of Cytogenetic Findings in Solid Tumors. **Cancer Genetic Cytogenetic**, v. 95, p. 1-8, 1997.

MORCH, L.S.; STAHLBERG, C.; LOKKEGAARD, E.; HUNDRUP, Y.A.; OBEL, E.B.; GRONBAEK, M. Amount of alcohol, drinking pattern and breast cancer among Danish nurses. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, p. S54-S54, 2005.

NATARAJAN, A.; BOEI, J. J. W.A. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 544, p. 299-304, 2003.

NEVILLE, P.J.; MORLAND, S.J.; VAZIRI, S.A.J.; CASEY, G. The genetics of breast and ovarian cancer. In: COWELL, J.K. (Editor). **Molecular Genetics of Cancer**, 2^a ed. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd, p. 53-70, 2001.

NUSSBAUM, R.L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F.; **THOMPSON & THOMPSON: Genética Médica**, 6^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS M. E. Chromosomal

aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, i. 1-2, p. 17-36, 2002.

OLIVEIRA, M.A.; SANTOS, G.C.; KANAMURA, C.T.; ALVES, V.A. Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v.25, n. 1, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO Cancer Control Programme**. Disponível em <www.who.int/cancer/en/> Acessado em 08 de maio de 2008.

PAYNE, S.J.L.; BOWEN, R.L.; JONES, J.L.; WELLS, C.A. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology**, v. 52, p. 82-90, 2008.

PAZ, W.A.; PAIM, S.P.; DE MELLO, G.L.; RANGEL, K.K.; CHRISTO, R.C.; GONÇALVES, R., SILVA, M.E.; BARROSO, A.A.; DE SOUZA, A.F. Biópsia de Linfonodo Sentinela – Experiência Clínica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

PEDROSO, W.; ARAÚJO, M.B.; STEVANATO, E. Atividade física na prevenção e na reabilitação do cancer. *Motriz*, Rio Claro, v. 11, n. 3, p. 155-160, 2005.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. Genética do Câncer Humano. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARKES, E.K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas, Ed. ULBRA, 2006.

PUPA, S.M.; TAGLIABUE, E.; ME´NARD, S.; ANICHINI, A. HER-2: A Biomarker at the Crossroads of Breast Cancer Immunotherapy and Molecular Medicine. **J Cell Physiol**, v. 205, p. 10-18, 2005.

ROGATTO, S.R. Citogenética sem Risco: Biossegurança e Garantia de Qualidade. Editora FUNPEC, Ribeirão Preto 2000.

ROGATTO, S.R.; RAINHO, C.A.; Citogenética Molecular e Câncer. FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Organizado por Marcelo Guerra – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C. G. & ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, p. 29-42, 2004.

TERRY, P.; MILLER, A.; ROHAN, T. Cigarette smoking and breast cancer risk: a long latency period? **International Journal of Cancer**, v. 100, p. 723-728, 2002.

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov> Acessado em 21 de junho de 2008.

VANDEN BEMPT, I.; DRIJKONINGEN, M.; DE WOLF-PEETERS, C. The complexity of genotypic alterations underlying HER2-positive breast cancer: an explanation for its clinical heterogeneity. **Current Opinion in Oncology**, v. 19, p. 552-557, 2007.

VARELLA-GARCIA, M. Molecular cytogenetics in solid tumors: Laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. **Oncologist**, v. 8, n. 1, p. 45-58, 2003.

VARELLA-GARCIA; KITTELSON M., J., *et al.* Multi-target interphase fluorescence in situ hybridization assay increases sensitivity of sputum cytology as a predictor of lung cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 4, p. 244-251, 2004.

VIANNA-MORGANTE, A.M. FISH no Estudo dos Cromossomos Humanos. FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Organizado por Marcelo Guerra – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

VIEIRA, D.S.C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008.

WANG, X.; THOMAS, P.; XUE, J.; FENECH, M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. **Mutation Research**, v.551, p.167-80, 2004.

ZINK, D.; FISCHER, A. H.; NICKERSON, J.A. Nuclear Structure in Cancer Cells. **Nature Reviews**, v. 4, p. 677-687, 2004.

8. Apêndices

8.1 Apêndice I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contacto. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc.

Também precisaremos de um fragmento do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia, e de um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas, serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ____/____/____

8.2 Apêndice II

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado para fornecer nova autorização caso sejam realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

8.3 Apêndice III

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG

QUESTIONÁRIO:

Data: __/__/__ Entrevistador: _____
Coleta: () sangue () tumor **Médico responsável:** _____

Dados Pessoais:

Nome do Paciente: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____
Profissão: _____ Escolaridade: _____
Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____
Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____
Naturalidade: _____ Descendência: _____
Raça e cor: () B () N () P

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____
Naturalidade: _____ Descendência: _____ Profissão: _____
Nome da mãe: _____
Naturalidade: _____ Descendência: _____ Profissão: _____
Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos Pessoais:

Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
Come CARNE regularmente? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____
Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não
Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente
Quantidade: _____
Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?
() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____

FUMA? () Sim () Não

FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência: _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª Gestação _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____ () E _____

Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total: _____

Histórico Médico

Casos de Câncer na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo de Câncer: _____

Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não

Local: _____

Grau de Parentesco: _____

Tem ou teve alguma outra doença grave? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Histórico do CAMA:

Observações:
